



01 FEV. 2005

REC'D 08 APR 2005

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 DEC. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr





## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: DATE DE DÉPÔT:	Jean LEHU BREVATOME 3, rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS France
Vos références pour ce dossier: B14577-DD2672	

<b>1 NATURE DE LA DEMANDE</b>				
Demande de brevet				
<b>2 TITRE DE L'INVENTION</b>				
		LABORATOIRE SUR PUCE COMPRENANT UN RESEAU MICRO-FLUIDIQUE ET UN NEZ D'ELECTRONEBULISATION COPLANAIRES		
<b>3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE</b>		Pays ou organisation	Date N°	
<b>4-1 DEMANDEUR</b>				
Nom	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE			
Rue	31-33, rue de la Fédération			
Code postal et ville	75752 PARIS 15ème			
Pays	France			
Nationalité	France			
Forme juridique	Etablissement Public de Caractère Scientifique, technique et Ind			
<b>5A MANDATAIRE</b>				
Nom	LEHU			
Prénom	Jean			
Qualité	Liste spéciale: 422-5 S/002, Pouvoir général: 7068			
Cabinet ou Société	BREVATOME			
Rue	3, rue du Docteur Lancereaux			
Code postal et ville	75008 PARIS			
N° de téléphone	01 53 83 94 00			
N° de télécopie	01 45 63 83 33			
Courrier électronique	brevets.patents@brevaalex.com			
<b>6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS</b>		Fichier électronique	Pages	Détails
Texte du brevet		textebrevet.pdf	41	D 37, R 3, AB 1
Dessins		dessins.pdf	16	page 16, figures 38, Abrégé: page 4, Fig.6
Désignation d'inventeurs				
Pouvoir général				

<b>7 MODE DE PAIEMENT</b>				
Mode de paiement		Prélèvement du compte courant		
Numéro du compte client		024		
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>				
Etablissement immédiat				
<b>9 REDEVANCES JOINTES</b>				
	Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt	EURO	0.00	0.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)	EURO	320.00	1.00	320.00
Total à acquitter	EURO			320.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

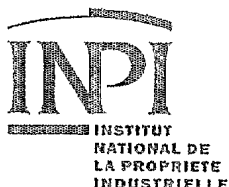
Signé par

Signataire: FR, Brevatome, J.L. Lehu

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

### Réception électronique d'une soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet : X

Demande de CU :

<b>DATE DE RECEPTION</b>	30 janvier 2004	
<b>TYPE DE DEPOT</b>	INPI (PARIS) - Dépôt électronique	<b>Dépôt en ligne: X</b>
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI</b>	0450173	<b>Dépôt sur support CD:</b>
<b>Vos références pour ce dossier</b>	B14577-DD2672	

**DEMANDEUR**

Nom ou dénomination sociale	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
Nombre de demandeur(s)	1
Pays	FR

**TITRE DE L'INVENTION**

LABORATOIRE SUR PUCE COMPRENANT UN RESEAU MICRO-FLUIDIQUE ET UN NEZ D'ELECTRONEBULISATION COPLANAIRES
---

**DOCUMENTS ENVOYES**

package-data.xml	Requetefr.PDF	application-body.xml
Design.PDF	ValidLog.PDF	fee-sheet.xml
FR-office-specific-info.xml	Comment.PDF	textebrevet.pdf
dessins.pdf	indication-bio-deposit.xml	request.xml

**EFFECTUE PAR**

Effectué par:	J. Lehu
Date et heure de réception électronique:	30 janvier 2004 14:13:39
Empreinte officielle du dépôt	07:A4:15:AE:F4:86:27:D8:57:02:26:E8:33:2D:11:82:FB:41:9E:48

/ INPI PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL  
INSTITUT 26 bis, rue de Saint Petersbourg  
NATIONAL DE 75800 PARIS cedex 08  
LA PROPRIETE Téléphone : 01 53 04 53 04  
INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 93 59 30

LABORATOIRE SUR PUCE COMPRENANT UN RESEAU MICRO-  
FLUIDIQUE ET UN NEZ D'ELECTRONEBULISATION COPLANAIRES

DESCRIPTION

5    **DOMAINE TECHNIQUE**

L'invention se rapporte à un laboratoire sur puce comprenant un réseau micro-fluidique et un nez d'électronébulisation coplanaires. Elle concerne en particulier le couplage d'un laboratoire sur puce avec  
10 un spectromètre de masse.

Depuis bientôt dix ans, de nombreuses voies ont été explorées pour coupler différents dispositifs micro-fluidiques aux spectromètres de masse. En effet, les méthodes de détection optiques comme la  
15 spectrophotométrie ou la fluorescence ne sont pas adaptées à la détection de biomolécules comme les protéines ou les peptides, détection qui intéresse particulièrement le domaine de la protéomique. Les limites sont soit la sensibilité, soit la nécessité de  
20 préparer l'échantillon (marquage fluorescent), ce qui, dans le cas de l'identification de protéines après digestion enzymatique par exemple, présente un problème puisque les peptides obtenus ne sont a priori pas connus. La spectrométrie de masse est donc souvent  
25 retenue puisqu'elle donne des informations sur la nature des échantillons analysés (spectre d'intensité selon le rapport masse/charge) avec une très bonne sensibilité (femtomole/pl), et qu'elle permet d'analyser des mélanges complexes de molécules. Pour  
30 cela, il est souvent nécessaire qu'un pré-traitement de l'échantillon soit réalisé en amont de l'analyse. Par

exemple, ce pré-traitement consiste en une séparation des composés chimiques et/ou biologique, précédée et/ou suivie d'une concentration des espèces.

Pour réaliser ce pré-traitement en continu  
5 avec l'analyse en un temps minimum et en minimisant les volumes de réactifs utilisés, les progrès récemment réalisés dans le domaine de la micro-fluidique peuvent être mis à profit. A titre d'exemples, des dispositifs micro-fluidiques de digestion enzymatique (Lian Ji Jin,  
10 "A microchip-based proteolytic digestion system driven by electroosmotic pumping", Lab Chip, 2003, 3, 11-18) , d'électrophorèse capillaire (B. Zhang et al., " Microfabricated Devices for Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry", Anal.  
15 Chem., vol. 71, n°15, 1999, 3259-3264) ou de séparation 2D (J.D. Ramsey, "High-efficiency Two dimensional Separations of Protein Digests on Microfluidic Devices", Anal. Chem., 2003, 75, 3758-3764 ou N. Gottschlich et al., "Two-Dimensional  
20 Electrochromatography / Capillary Electrophoresis on a Microchip", Anal. Chem.2001, 73, 2669-2674) ont déjà été présentés.

Le couplage microfluidique / spectrométrie de masse peut reposer sur une technique d'ionisation de  
25 l'échantillon par électronébulisation ou électrospray (ou ESI pour ElectroSpray Ionization). A pression atmosphérique et plongé dans d'un champ électrique intense, l'échantillon liquide pré-traité sortant de la puce micro-fluidique est nébulisé en un gaz d'ions ou  
30 en une multitudes de gouttelettes chargées pouvant entrer dans le spectromètre de masse (MS) pour analyse.

Cette nébulisation passe par la déformation de l'interface formée entre le liquide sortant et le gaz environnant (ménisque liquide/gaz) et la « goutte » de liquide prend une forme conique appelée « cône de Taylor ». Le volume de ce cône constitue un volume mort pour le liquide sortant (espace géométrique dans lequel les composés chimiques peuvent se mélanger), ce qui n'est pas souhaitable, surtout quand la dernière étape du pré-traitement consiste justement en une séparation des composés chimiques de l'échantillon. C'est pourquoi on cherche toujours à minimiser la taille de ce cône, et cela passe entre autres par la réduction des dimensions intérieures et extérieures du canal de sortie de la puce micro-fluidique.

Classiquement, au cours d'une analyse par spectrométrie de masse, l'échantillon est pré-traité « hors dispositif ESI » puis placé manuellement (à la pipette) dans une aiguille creuse dont l'extrémité est électriquement conductrice (« PicoTip emitter » de New Objective par exemple). Un champ électrique est imposé entre la partie conductrice du PicoTip et l'entrée du MS, ce qui permet la formation d'un cône de Taylor à la sortie du PicoTip et la nébulisation de l'échantillon. La géométrie cylindrique « pointue » des PicoTip est idéale pour la formation d'un petit cône de Taylor, mais les limites sur la minimisation de leur taille (classiquement de diamètre extérieur 360  $\mu\text{m}$  et de diamètre intérieur 10  $\mu\text{m}$ ), celles sur l'obtention d'une bonne reproductibilité par les techniques de fabrication utilisées (étirement) et leur fragilité à l'utilisation sont les principales raisons pour



chercher à réaliser d'autres types de dispositifs de nébulisation.

Dans la littérature, lorsque ces dispositifs sont élaborés par des micro-technologies  
5 comme les technologies planes du silicium par exemple (gravure, usinages, dépôts en couches minces et photolithographie de matériaux divers sur des substrats présentant des dimensions latérales très grandes devant leur épaisseur), on parle souvent de « nez  
10 électrospray » (Tai et al., "MEMS electrospray nozzle for mass spectroscopy", WO-A-98/35376). L'enjeu de telles réalisations est double.

D'une part, les micro-technologies peuvent permettre de réaliser des interfaces ESI en définissant  
15 des structures de type pointe (comme les PicoTips) mais plus petites (pour limiter le volume du cône de Taylor), plus reproductibles et moins fragiles, ce qui présente un intérêt en soi (voir le document WO-A-00/30167).

20 D'autre part, les micro-technologies peuvent permettre de réaliser des dispositifs intégrant un réseau fluide permettant d'assurer le pré-traitement de l'échantillon et une interface de type ESI. Outre les avantages précédemment cités (diminution  
25 des volumes morts de sortie, reproductibilité, robustesse de l'interface ESI), on bénéficie de ceux liés à un dispositif de pré-traitement intégré (protocole de pré-traitement en continu avec l'analyse, diminution des temps globaux d'analyse, minimisation  
30 des volumes de réactifs).

Néanmoins, une telle intégration pose trois problèmes majeurs de conception technologique :

- Premièrement, la technologie de réalisation du dispositif doit être compatible avec celle d'un réseau fluide de pré-traitement (réservoirs, micro-canaux, réacteurs...) et d'une interface ESI (géométrie en pointes, dimensions de sortie minimales...), et ce, pour permettre de réaliser le dispositif complet sur un même support ou un même ensemble de supports voyant un enchaînement technologique commun aux deux entités intégrées.

- En second lieu, elle doit être pensée pour ne pas rajouter de volume mort supplémentaire à ceux qui pourraient exister dans le réseau fluide de pré-traitement et dans l'interface ESI pris séparément.

- Enfin, elle doit fournir à l'interface ESI une électrode de nébulisation sans ajouter de volume mort au système. Cette électrode de nébulisation peut être localisée soit à l'extérieur de la structure en pointe (M.Svederberg et al., "Sheathless Electrospray from Polymer Microchips", Anal. Chem., 2003, 75, 3934-3940), soit à l'intérieur du canal de sortie et à proximité de la sorte du dispositif. Dans le premier cas, un champ électrique est imposé uniquement à l'extérieur du dispositif, dans la portion d'air (ou d'un autre gaz) située entre l'extrémité de la pointe et l'entrée du MS. Dans le second cas, un champ électrique existe aussi à l'intérieur du dispositif, dans le segment de liquide situé entre l'électrode et l'extrémité de la pointe. Pour l'implantation d'une électrode externe, il est souvent

rapporté (R.B. Cole, "Electrospray ionization mass spectrometry : fundamentals, instrumentation and applications", John Wiley & Sons : New York, 1997) qu'une difficulté majeure est de lui assurer une robustesse suffisante. En effet, les dépôts conducteurs réalisés à cet effet se dégradent très souvent trop rapidement sous l'action des champs électriques intenses.

## 10 ÉTAT DE LA TECHNIQUE ANTÉRIEURE

Dès 1997, R.S. Ramsey et J.M. Ramsey, ("Generating Electrospray from Microchip Devices Using Electroosmotic Pumping", Anal. Chem., 1997, 69, 1174-1178) ont proposé une puce microfluidique en verre dont les flux de liquide sont générés par pompage électro-osmotique et dont le canal de sortie débouche dans la tranche du composant à géométrie plane. Sous l'assistance d'une surpression imposée en amont, il se forme en sortie de puce une goutte d'échantillon de 12 nl, qui, sous l'action d'un champ électrique intense, forme un cône de Taylor en se nébulisant. Cette approche simple pose le problème d'un volume mort de liquide important (12 nl), d'où une limite de sensibilité du dispositif.

Plus récemment, K. Huikko et al. ("Poly(dimethylsiloxane) electrospray devices fabricated with diamond-like-carbon-poly(dimethylsiloxane) coated SU-8 masters", Lab Chip, 2003, 3, 67-72) ont proposé une puce en poly(diméthylsiloxane) (PDMS) présentant elle aussi des

canaux débouchants destinés à être mis en regard d'un MS pour nébulisation de l'échantillon. Les auteurs tirent profit de l'hydrophobie du PDMS pour l'obtention d'un petit cône de Taylor d'où la limitation du volume mort de sortie. Néanmoins, le dispositif proposé n'intègre pas d'électrode de nébulisation. Les tests sont réalisés en utilisant un fil de platine plongeant dans le réservoir d'entrée du canal de l'ESI, ce qui ne peut pas constituer une bonne solution, c'est-à-dire sans ajout de volume mort, pour une éventuelle intégration à un réseau fluide de pré-traitement. Par ailleurs, la technologie PDMS reste une technologie limitée qui ne permet pas encore la conception de réseaux micro-fluidiques complexes et de taille caractéristique de l'ordre du micromètre. Ceci impose une forte limitation quant au dessin des entités micro-fluidiques nécessaires aux pré-traitements d'échantillons (concentration, séparation...).

M.Svederberg et al. ("Sheathless Electrospray from Polymer Microchips", Anal. Chem., 2003, 75, 3934-3940) proposent des dispositifs en polymère qui présentent des géométries très intéressantes pour la réalisation de nez électrospray (pointes 2D ou 3D) mais les dimensions du canal de sortie (100  $\mu\text{m}$  de largeur  $\times$  70  $\mu\text{m}$  de hauteur) obtenues par leur technologie d'usinage sont rédhibitoires pour la réalisation d'un dispositif à faibles volumes morts. En effet, on rappelle que le diamètre de sortie d'un PicoTip est de seulement 10  $\mu\text{m}$ . En outre, l'utilisation de matériaux polymères impose de fortes limites quant à d'éventuelles fonctionnalisations chimiques ou

biologiques des parois internes du canal de sortie ou d'un éventuel réseau fluide de pré-traitement d'échantillon. En effet, jusqu'à maintenant, la plupart de ces fonctionnalisations ont été développées sur silicium ou sur verre. Par ailleurs, la technologie de fabrication proposée n'est pas collective et l'électrode de nébulisation est réalisée sur la partie extérieure de la pointe d'ESI.

V. Gobry et al. ("Microfabricated polymer injector for direct mass spectrometry coupling", Proteomics 2002, 2, 405-412), J. Kameoka et al. ("An electrospray ionization source for integration with microfluidic", Anal. Chem. 2002, 74, 5897-5901) et J. Wen et al. (Electrophoresis 2000, 21, 191-197) proposent aussi la réalisation de nez électrospray en matériaux polymères à géométrie bidimensionnelle adaptée à la formation d'un cône de Taylor stable et limitant les volumes morts. Mais la technologie utilisée ne propose pas l'intégration d'une électrode de nébulisation. Les tests sont réalisés à l'aide d'un fil d'or plongeant dans un réservoir d'entrée du dispositif.

Une autre approche consiste en l'adaptation de la sortie du canal de séparation pour permettre d'accueillir un PicoTip du commerce (Y. Tachibana et al., "Robust and simple interface for microchip electrophoresis-mass spectrometry", J. of Chromatography, 1011 (2003), 181-192). Cela passe par l'utilisation d'une pièce métallique et/ou plastique jouant un rôle de liaison dans l'assemblage des deux

entités. Ce genre d'assemblage présente des volumes  
morts importants et ne résout pas le problème de  
l'utilisation des PicoTips du commerce présentant une  
certaine irreproductibilité en dimensions et une grande  
5 fragilité à l'utilisation.

Deux documents d'une équipe du « California  
Institute Of Technology » peuvent aussi être cités :  
Tai et al., "MEMS electrospray nozzle for mass  
spectroscopy", WO-A-98/35376 et Tai et al., "Polymer-  
10 based electrospray nozzle for mass spectrometry",  
WO-A-00/30167. Les technologies revendiquées pour  
réaliser un nez électrospray muni d'un filtre amont  
sont des technologies de surface permettant de réaliser  
des structures creuses dans du nitrure de silicium dans  
15 le premier cas et dans du parylène dans le second. Ces  
technologies de surface reposent sur l'utilisation  
d'une couche sacrificielle (en verre au phosphosilicate  
PSG), qui comme son nom l'indique, n'est pas conservée  
jusqu'à la fin de l'enchaînement technologique. Le  
20 retrait de cette couche, réalisée par gravure chimique,  
détermine les structures creuses. D'un point de vue  
géométrique, ces technologies sont intéressantes  
(formes en pointes du nez), mais elles ne proposent pas  
l'intégration d'électrodes de nébulisation et les  
25 auteurs utilisent la voie classique du fil de platine  
plongeant dans un réservoir d'entrée pour tester leur  
système, ce qui est rédhibitoire pour l'obtention d'un  
système fluide complet (pré-traitement et nez  
électrospray) à faibles volumes morts.

30 Enfin, J.E. Moon et al. dans le brevet  
américain No. 6 464 866 revendiquent un système

d'analyse chimique fabriqué par microtechnologie à partir de deux substrats, de préférence en silicium, et comprenant un système de chromatographie liquide et un dispositif d'électrospray. Le dispositif divulgué dans  
5 ce document comporte une pointe du nez électrospray perpendiculaire au plan des substrats utilisés. Cette disposition n'évite donc pas les volumes morts dus aux changements de direction.

## 10 EXPOSÉ DE L'INVENTION

La présente invention propose un dispositif micro-fluidique permettant divers traitements d'échantillons et disposant d'une bonne interface avec un spectromètre de masse de type ESI, ce qui  
15 nécessite :

- Une technologie de réalisation compatible avec celle d'un réseau fluide de pré-traitement (réservoirs, micro-canaux, réacteurs...) et d'une interface ESI en sortie (géométrie en pointes,  
20 dimensions de sortie minimales...), et ce, pour permettre de réaliser le dispositif complet sur un même support ou un même ensemble de supports voyant un enchaînement technologique commun aux deux entités intégrées.

- Une conception d'intégration sans volumes  
25 morts.

- L'intégration d'une électrode de nébulisation à l'intérieur du canal de sortie et en proximité de la sortie du dispositif.

L'invention a donc pour objet un  
30 laboratoire sur puce comprenant un support, au moins un

réseau fluidique, au moins un orifice d'entrée de fluide relié au réseau fluidique et au moins un orifice de sortie de fluide relié au réseau fluidique, caractérisé en ce qu'il comprend une couche mince  
5 solidaire du support et dans laquelle sont réalisés le réseau fluidique et un nez d'électronébulisation, le nez d'électronébulisation étant en surplomb par rapport au support et comprenant un canal dont une extrémité est reliée au réseau fluidique et dont l'autre  
10 extrémité constitue ledit orifice de sortie de fluide, le canal étant équipé de moyens de conduction électrique formant au moins une électrode.

La face arrière du support, c'est-à-dire celle qui ne supporte pas la couche mince, peut  
15 avantageusement être de nature inerte. Elle ne participe alors pas au fonctionnement du dispositif. En particulier, elle ne présente alors pas de connexion électrique.

Selon une première variante de réalisation,  
20 la couche mince est la couche de matériau semi-conducteur d'un substrat du type semi-conducteur sur isolant, le reste du substrat constituant ledit support. Ce substrat de type semi-conducteur sur isolant peut être un substrat SOI. Les moyens de  
25 conduction électrique peuvent être une partie dopée de ladite couche de matériau semi-conducteur.

Le laboratoire sur puce peut comprendre un capot recouvrant hermétiquement le réseau fluidique, ce capot étant pourvu d'un moyen d'accès fluidique à  
30 l'orifice d'entrée de fluide.



Selon une autre disposition, le laboratoire sur puce peut comprendre un capot recouvrant hermétiquement le réseau fluide, ce capot étant pourvu d'un moyen d'accès fluide à l'orifice d'entrée de fluide et étant pourvu desdits moyens de conduction électrique.

Selon une deuxième variante de réalisation, la couche mince est une couche fixée sur le support. Si le support est en matériau semi-conducteur, les moyens de conduction électrique peuvent être une partie dopée dudit support.

Ce laboratoire peut comprendre un capot recouvrant hermétiquement le réseau fluide, ce capot étant pourvu d'un moyen d'accès fluide à l'orifice d'entrée de fluide.

Selon une autre disposition, le laboratoire sur puce peut comprendre un capot recouvrant hermétiquement le réseau fluide, ce capot étant pourvu d'un moyen d'accès fluide à l'orifice d'entrée de fluide et étant pourvu desdits moyens de conduction électrique.

L'utilisation d'un capot permet de rendre le réseau fluide étanche.

#### BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemple non limitatif, accompagnée des dessins annexés parmi lesquels :

- la figure 1 est un schéma d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,

- la figure 2 représente la structure COMOSS d'un réacteur de digestion enzymatique utilisé dans le laboratoire sur puce de la figure 1,
- la figure 2A montre un détail de la  
5 figure 2,
- la figure 3 représente la structure COMOSS d'un réacteur de pré-concentration utilisé dans le laboratoire sur puce de la figure 1,
- la figure 3A montre un détail de la  
10 figure 3,
- la figure 4 représente la structure COMOSS d'un réacteur de chromatographie utilisé dans le laboratoire sur puce de la figure 1,
- la figure 4A montre un détail de la  
15 figure 4,
- la figure 5 est une vue agrandie d'un détail de la figure 1 montrant l'interface ESI,
- les figures 6A à 6D illustrent un premier mode de réalisation d'un laboratoire sur puce selon la  
20 présente invention,
- les figures 7A et 7B, illustrent un deuxième mode de réalisation d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,
- les figures 8A à 8D illustrent un  
25 troisième mode de réalisation d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,
- les figures 9A à 9H illustrent un quatrième mode de réalisation d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,

- les figures 10A et 10E illustrent un cinquième mode de réalisation d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,

5 - les figures 11A à 11F illustrent un sixième mode de réalisation d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,

- la figure 12 illustre une vue de dessus d'un substrat comprenant une pluralité de dispositifs selon la présente invention.

10

#### **EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS**

La figure 1 est un schéma d'un laboratoire sur puce 1 selon la présente invention. Ce dispositif peut avoir 18 mm de longueur sur 5 mm de largeur.

#### 15 Le réseau fluidique

On décrit d'abord le réseau fluidique destiné à préparer un échantillon biologique complexe afin d'en identifier le contenu protéique. Ce réseau fluidique est constitué d'un ensemble de réservoirs et de canaux, d'un réacteur de digestion enzymatique, d'un  
20 réacteur de pré-concentration et d'un réacteur de séparation par électro-chromatographie liquide. La structure de base de tous ces réacteurs est une cavité profonde munie d'un grand nombre de plots de section carrée ou hexagonale...Ce genre de structure est connue  
25 sous le nom de COMOSS (pour "Collocated MONolith Support Structures"). On peut se référer à ce sujet à l'article de Bing He et al. intitulé "Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography", Anal. Chem.

1998, 70, 3790-3797. Pour tous les réacteurs, on tire  
avantage des grands rapports surface/volume développés  
par ces structures COMOSS, rapports qui augmentent les  
probabilités de « rencontre » entre les molécules des  
5 phases mobiles (protéines par exemple pour le réacteur  
de digestion enzymatique) et celles des phases  
stationnaires (trypsine par exemple pour le réacteur de  
digestion enzymatique).

Après pré-remplissage complet du réseau  
10 fluide par du tampon, l'échantillon biologique  
(protéine) est déposé dans le réservoir R1, puis pompé  
en électroosmose du réservoir R1 vers le réservoir R2 à  
travers le réacteur de digestion enzymatique 2. Des  
réservoirs de grands volumes sont disposés entre les  
15 différents réacteurs du réseau fluide afin de  
permettre un changement de tampon entre deux étapes  
consécutives du protocole. Ainsi, R1 contient du  
bicarbonate d'ammonium ( $[\text{NH}_4\text{HCO}_3]=25 \text{ mM}$ ;  $\text{pH} = 7,8$ ), R2,  
R3 et R4 contiennent un mélange eau/acétonitrile  
20 ACN/acide formique TFA (95% ; 5% ; 0,1%), tandis que R5  
contient un mélange eau/acétonitrile/acide formique  
(20% ; 80% ; 0,1%). Le digest récupéré dans le  
réservoir R2 doit être concentré avant séparation. Pour  
cela, il est pompé en électro-osmose vers le réservoir  
25 R3 (poubelle). L'ensemble des peptides résultant de la  
digestion enzymatique est alors « capté » par le  
réacteur de pré-concentration 3 de faible volume, d'où  
la concentration. Un gradient d'acétonitrile, réalisé  
par mélange du tampon de R4 et de celui de R5 dans la  
30 structure 4 de type « serpent » (2cm de longueur),  
vient ensuite décrocher sélectivement les peptides

selon leur affinité avec la phase stationnaire (C18 par exemple) du réacteur de pré-concentration 3. Ceux-ci sont « captés » de nouveau par la colonne de chromatographie 5, plus dense que le réacteur de pré-concentration 3. L'enrichissement du mélange en ACN permet de nouveau de décrocher sélectivement ces peptides de la colonne de chromatographie 5, et de les emmener, séparés, vers la sortie 6 de la puce 1 où le liquide est nébulisé vers l'entrée d'un spectromètre de masse non représenté.

Un réacteur d'affinité à une protéine donnée (non représenté) peut servir à capter celle-ci dans un mélange mutli-protéique véhiculé à travers ce réacteur. Pour cela, on peut intégrer en amont du réseau fluide décrit ci-dessus un ensemble réservoirs/réacteur d'affinité/réacteur de concentration fonctionnant selon les mêmes principes fluidiques que précédemment décrit. Le réacteur d'affinité peut être fonctionnalisé d'anticorps et le tampon d'élution peut être constitué de protéines concurrentes (vis-à-vis de l'anticorps) à celle qu'on souhaite « capter » dans le complexe multi-protéique.

✓ le réacteur d'affinité amont

De structure COMOSS, il est destiné à capter de manière spécifique une protéine, une famille de protéines, ou un complexe multi-protéique dans l'échantillon biologique complexe. Les outils utilisés pour cette étape peuvent être des anticorps, mais aussi par exemple des petites molécules qui ont une

spécificité d'interaction avec la (les) protéine(s) recherchée(s).

✓ le réacteur de digestion enzymatique

5 La structure COMOSS du réacteur de digestion enzymatique, représenté à la figure 2, est réalisée à partir d'un ensemble de plots de section hexagonale de 10  $\mu\text{m}$  permettant de définir un réseau de canaux d'environ 5  $\mu\text{m}$ . Sa largeur utile a est constante 10 (640  $\mu\text{m}$ ), mais sa largeur réelle b fait 892  $\mu\text{m}$ . La longueur c de la partie active du réacteur fait 15 mm. Ses autres caractéristiques géométriques, à lire en parallèle avec la figure 2, sont décrites dans le tableau suivant :

15

Entité	Largeur des canaux ( $\mu\text{m}$ )	Murs de séparation ( $\mu\text{m}$ )
Canal de liaison	640	0
Etage 1	2*320	1*128
Etage 2	4*160	3*64
Etage 3	8*80	7*32
Etage 4	16*40	15*16
Etage 5	32*20	31*8
Etage 6	64*10	63*4

Cette structure permet éventuellement d'organiser des « billes » de silice de quelques micromètres (Billes Bangs Laboratories distribuées par

Serotec France par exemple) fonctionnalisées (Trypsine par exemple) afin d'apporter au réacteur ses propriétés enzymatiques ou de les accroître.

5 A titre d'exemple, l'enzyme greffée sur les plots peut être de la trypsine. Le protocole utilisé est celui décrit dans le document FR-A-2 818 662.

La figure 2A montre un détail de la zone du réacteur référencée 11 sur la figure 2. On reconnaît les plots 12 de section hexagonale permettant de  
10 définir le réseau de canaux 13. La référence 14 désigne des billes de silice éventuellement utilisées.

✓ le réacteur de pré-concentration

La structure COMOSS du réacteur de pré-concentration, représenté à la figure 3, est réalisée à  
15 partir d'un ensemble de plots de section carrée de 10  $\mu\text{m}$  permettant de définir un réseau de canaux d'environ 2  $\mu\text{m}$ . Sa largeur utile d est constante (160  $\mu\text{m}$ ), mais sa largeur réelle e fait 310  $\mu\text{m}$ . La  
20 longueur f de la partie active du réacteur fait 170  $\mu\text{m}$ . Ses autres caractéristiques géométriques, à lire en parallèle avec la figure 3, sont décrites dans le tableau suivant :

Entité	Largeur des canaux ( $\mu\text{m}$ )	Murs de séparation ( $\mu\text{m}$ )
Canal de liaison	160	0
Etage 1	2*80	1*80
Etage 2	4*40	3*40

Etage 3	8*20	7*20
Etage 4	16*10	15*10

Cette structure permet éventuellement d'organiser des billes de silice fonctionnalisées afin d'apporter au réacteur ou d'en accroître ses propriétés d'affinité (greffage C18 par exemple).

La figure 3A montre un détail de la zone du réacteur référencée 21 sur la figure 3. On reconnaît les plots 22 de section carrée permettant de définir le réseau de canaux 23.

✓ le réacteur de séparation par électrochromatographie liquide

La structure COMOSS du réacteur de séparation, représenté à la figure 4, est réalisée à partir d'un ensemble de plots de section carrée de 10  $\mu\text{m}$  permettant de définir un réseau de canaux d'environ 2  $\mu\text{m}$ . Sa largeur utile  $g$  est constante (160  $\mu\text{m}$ ), mais sa largeur  $h$  réelle fait 310  $\mu\text{m}$ . La longueur  $i$  de la partie active du réacteur fait 12 mm. Ses autres caractéristiques géométriques, à lire en parallèle avec la figure 4, sont décrites dans le tableau suivant :

Entité	Largeur des canaux ( $\mu\text{m}$ )	Murs de séparation ( $\mu\text{m}$ )
Canal de liaison	160	0
Etage 1	2*80	1*80



Etage 2	4*40	3*40
Etage 3	8*20	7*20
Etage 4	16*10	15*10

Pour un gain de place, le réacteur peut être réalisé en trois parties de 12 mm de longueur chacune comme le montre la figure 1.

5                    Cette structure permet éventuellement d'organiser des billes de silice fonctionnalisées afin d'apporter au réacteur ou d'en accroître ses propriétés d'affinité (greffage C18 par exemple).

10                   La figure 4A montre un détail de la zone du réacteur référencée 31 sur la figure 4. On reconnaît les plots 32 de section carrée permettant de définir le réseau de canaux 33.

#### Interface ESI

15                   La figure 5 est une vue agrandie de la sortie de la puce, référencée 6 sur la figure 1. Le canal de sortie 40 est planaire et d'axe rectiligne par rapport au réseau fluïdique. En d'autres termes, le canal de sortie 40 reste parallèle aux plans des  
20 différents substrats utilisés pour la réalisation. Cette configuration évite les volumes morts que pourrait occasionner le parcours partiel ou total de l'épaisseur de l'un ou de plusieurs de ces substrats, après avoir parcouru une portion parallèle aux plans de  
25 ces substrats. On évite ainsi tout virage, ce qui comme il a été souligné précédemment est primordial,

notamment pour véhiculer des échantillons antérieurement séparés.

La section du canal de sortie 40 peut être adaptée en travaillant préférentiellement sur les cotes transversales (dans le plan du substrat) de celui-ci, ce qui donne la possibilité de réaliser « des restrictions douces » évitant les volumes morts. Sur la figure 5, ces propos sont illustrés par l'existence d'un « raccord » 41 entre la sortie du canal du réacteur de chromatographie 5 et le canal de sortie 40. Une telle restriction est indispensable pour raccorder des structures fluidiques de « grosses » dimensions (« gros » volumes, « grosse » capacité d'affinité par exemple...) à une structure du type interface ESI pour qui, comme on l'a souligné précédemment, il est souhaitable de minimiser la surface de sortie en atteignant typiquement des dimensions de l'ordre du micromètre à quelques micromètres.

En bout de dispositif, le canal de sortie 40 débouche dans une structure de type pointe 42, structure à section extérieure variable permettant de limiter la surface des interfaces liquide / gaz et liquide / solide présentée par le liquide sortant avec son environnement, grâce à son extrémité de faibles sections intérieures et extérieures, tout en conservant une robustesse lors de son utilisation grâce à son extrémité de large section.

Enfin, l'intérieur du canal de sortie 40 est muni d'une électrode 43 permettant d'imposer un potentiel électrique au liquide se présentant à la sortie du dispositif, ce qui est nécessaire pour

nébuliser l'échantillon (stabilité du cône de Taylor) et/ou participer à son pompage électroosmotique.

L'ensemble de ces éléments fournit une interface ESI plane complète, puisque robuste, sans  
5 volumes morts de raccordement aux réseaux fluidiques et permettant la naissance d'une cône de Taylor de bonne stabilité.

On va maintenant décrire différents modes de réalisation du dispositif microfluidique muni d'une  
10 structure d'électronébulisation selon l'invention. Seul le mode de réalisation préféré, le cinquième, sera décrit en détail.

Pour plus de clarté, ces descriptions sont faites à l'échelle d'une puce (un dispositif), mais les  
15 différentes filières technologiques sont réalisées sur des substrats pouvant comporter plusieurs dispositifs (substrats circulaires de 100 mm par exemple).

Dans ces descriptions, le réseau fluidique est simplifié et réduit à un réservoir d'entrée, un  
20 canal d'entrée, un microréacteur et un canal de sortie à section constante débouchant dans la structure de type pointe. L'homme de l'art dessinera le réseau fluidique qu'il souhaite, par exemple celui décrit précédemment.

25

#### Premier mode de réalisation

Ce mode de réalisation est illustré par les figures 6A à 6D. Il n'utilise qu'un seul substrat SOI. De tels substrats sont commercialisés par la société  
30 « Soitec ». Les électrodes, les pistes conductrices et

les reprises de contact électrique sont réalisées en une seule étape de dopage localisé du silicium.

La figure 6A montre un substrat SOI 50 constitué d'un support 51 en silicium de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, supportant successivement une couche d'oxyde de silicium 52 de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et une couche mince 53 de silicium de 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. La couche mince 53 est dopée localement pour fournir un premier circuit électriquement conducteur formé des zones 54 et 55 et un deuxième circuit électriquement conducteur formé des zones 56 et 57.

Le dopage de la couche mince de silicium 53 est réalisé à travers un masque de résine photosensible (ou d'oxyde de silicium) sur l'intégralité de l'épaisseur de cette couche.

La figure 6B illustre la réalisation du réseau fluidique dans la couche mince 53. Le réseau fluidique est obtenu par gravure DRIE (pour « Deep Reactive Ion Etching »).

La gravure de la couche mince de silicium 53 est partielle (20  $\mu\text{m}$ ) dans la partie destinée à constituer le réseau fluidique afin de conserver une portion de piste de silicium dopé (5  $\mu\text{m}$ ) au fond de certaines zones du réseau fluidique (en particulier près de sa sortie pour réaliser l'électrode de nébulisation). Le réseau fluidique réalisé comprend un réservoir d'entrée 61, un canal d'entrée 62, un microréacteur 63 et un canal de sortie 64. Au niveau de la structure de type pointe, le canal de sortie définit ici présente alors deux parois latérales et une paroi horizontale (« le sol »). On remarque qu'une extrémité

58 de la zone dopée 55 est située au fond du réservoir d'entrée 61 et qu'une extrémité 59 de la zone dopée 57 est située au fond d'une partie du canal de sortie 64.

Cette étape constitue une étape clef  
5 puisqu'elle rend possible une continuité en profondeur du réseau fluidique et du canal de sortie. Ainsi, une connectique à « zéro volume mort » est rendue possible. Ce sera le cas dans tous les autres modes de réalisation.

10 La figure 6C illustre le dégagement de la pointe. Ceci est obtenu par gravure chimique de la partie de la couche d'oxyde 52 située sur la partie droite de la figure.

Après cette gravure, la structure de type  
15 pointe 65 est libérée et forme un surplomb au-dessus du support 51. Il faut noter que le canal de sortie 64 comporte toujours le sol 66.

On réalise ensuite une étape d'isolation  
électrique du réseau fluidique. Ceci est obtenu par une  
20 oxydation thermique de 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur du silicium de la couche mince 53. Le support 51 en silicium ne doit pas être oxydé sinon la structure de type pointe 65 ne serait plus en surplomb.

Cette étape d'oxydation thermique est  
25 nécessaire pour isoler électriquement le liquide présent dans le réseau fluidique de l'extérieur. Cette isolation électrique est nécessaire, par exemple, lorsque le pompage électroosmotique est utilisé ou qu'une séparation par électrophorèse ou qu'une réaction  
30 électrochimique siègent dans le réseau fluidique.

L'étape suivante consiste à dégager les contacts électriques. Pour dégager les électrodes (les extrémités 58 et 59) et les reprises de contact (les zones 54 et 56), il est nécessaire de graver localement la couche de  $\text{SiO}_2$  thermique (3  $\mu\text{m}$ ) réalisée précédemment. Cette étape peut être réalisée par une technique de gravure par laser proposée par la Société NovaLase de Pessac (Gironde, France).

Pour obtenir le laboratoire sur puce selon l'invention, le support 51 est clivé comme le montre la figure 6D pour dégager la structure de type pointe 65.

Second mode de réalisation : fermeture par un capot de pyrex structuré du dispositif décrit dans le premier mode de réalisation

Selon ce mode de réalisation, le dispositif 70 (voir la figure 7A) obtenu par le premier mode de réalisation, avant l'étape de clivage finale est scellé à une plaque de recouvrement 71. La plaque de recouvrement 71 comporte une partie d'extrémité 72 en surplomb pour que la plaque 71 ne recouvre pas la structure de type pointe 65. Elle comporte également un trou traversant 73 destiné à assurer une communication fluide avec le réservoir d'entrée 61 du dispositif 70. La plaque de recouvrement 71 peut être un substrat de pyrex, par exemple celui disponible sous la référence Corning 7740.

Une fois le scellement obtenu, on procède à trois clivages. Un premier clivage de la plaque 71 et un clivage du support 51 du dispositif 70 permet de libérer le nez d'électronébulisation. Un deuxième

clivage de la plaque 71 permet de libérer les reprises de contact 54 et 56.

5 Troisième mode de réalisation (variante du premier mode de réalisation)

Ce mode de réalisation est illustré par les figures 8A à 8D. Il n'utilise qu'un seul substrat SOI. Les électrodes, les pistes conductrices et les reprises  
10 de contact électrique sont réalisées en une seule étape de "lift-off" de métal (aluminium, platine, or, etc.).

La figure 8A montre un substrat SOI 80 constitué d'un support 81 en silicium de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, supportant successivement une couche  
15 d'oxyde de silicium 82 de 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et une couche mince 83 de silicium de 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.

La figure 8B illustre la réalisation du réseau fluide dans la couche mince 83. Le réseau fluide est obtenu par gravure DRIE.

20 La gravure de la couche supérieure de silicium 83 est :

- soit partielle afin de conserver un « sol » de silicium au canal de sortie et notamment à la portion du canal de sortie débouchant dans la  
25 structure de type pointe (comme représenté pour le premier et le second mode de réalisation),

- soit totale afin de réaliser un canal de sortie de type « fente » au niveau de la structure de type pointe (comme représenté sur la figure 8B).

30 Par ailleurs, dans ce dernier cas, la gravure peut être éventuellement poursuivie à travers

la couche d'oxyde 82, puis dans le support en silicium 81, afin de réaliser un réseau fluide de grande profondeur.

5 Le réseau fluide réalisé comprend un réservoir d'entrée 91, un canal d'entrée 92, un microréacteur 93 et un canal de sortie 94. La gravure de la couche mince 83 définit également la structure de type pointe 95.

10 La structure de type pointe 95 est ensuite dégagée par gravure chimique totale de la partie de la couche d'oxyde 82 qui a été révélée par la gravure de la couche 83 et aussi de celle qui se trouve sous la structure de type pointe 95 (voir la figure 8C).

15 On réalise ensuite une étape d'isolation électrique du réseau fluide. Ceci est obtenu par une oxydation thermique de 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur du silicium de la couche mince 83.

20 On réalise ensuite, par "lift-off" de métal, les reprises de contact 84 et 86, les électrodes 88 (au fond du réservoir d'entrée) et 89 (dans le canal du nez d'électronébulisation) ainsi que les pistes conductrices 85 et 87 reliant chaque électrode à sa reprise de contact correspondante (voir la figure 8D). Le support 81 peut alors être clivé pour dégager la structure en pointe 95.

#### Quatrième mode de réalisation (variante du second mode de réalisation) :

30 Il s'agit d'une variante du second mode de réalisation dans lequel l'utilisation d'un substrat SOI



est remplacée par l'utilisation de deux substrats de silicium.

La figure 9A montre un substrat de silicium 100 présentant une face 102 sur laquelle sont réalisés, par dopage localisé, deux circuits électriquement conducteurs. Le premier circuit conducteur est formé des zones 104 et 105 et le deuxième circuit conducteur est formé des zones 106 et 107.

Le substrat 100 subit ensuite, à partir de la face 102, une gravure RIE (pour "Reactive Ion Etching") ou une gravure chimique au moyen de KOH pour obtenir un évidement 101 en prévision de la structure de type pointe et du clivage du substrat (voir la figure 9B).

Un autre substrat 110 en silicium est ensuite fixé par scellement direct sur la face 102 du substrat 100 (voir la figure 9C).

Le substrat 110 est ensuite aminci jusqu'à obtenir une couche mince 111 (voir la figure 9D).

Le réseau fluïdique est ensuite réalisé comme cela est montré à la figure 9E. Au cours de cette étape, la couche mince 111 subit partiellement ou totalement une gravure DRIE. Le réseau fluïdique comprend un réservoir d'entrée 121, un canal d'entrée 122, un microréacteur 123 et un canal de sortie 124. La gravure de la couche mince 111 définit également la structure de type pointe 125.

Comme pour les modes de réalisation précédents, on réalise ensuite une étape d'isolation électrique du réseau fluïdique. Ceci est obtenu par une oxydation thermique.

L'étape suivante a pour objet de dégager les reprises de contact 104 et 106 (voir la figure 9F). Pour cela il est nécessaire de graver localement la couche mince 111 et l'oxyde thermique. Cette étape peut  
5 être réalisée par une technique de gravure par laser. Elle permet de dégager également les électrodes 128 et 129 respectivement situées au fond du réservoir d'entrée 121 et au fond du canal de sortie 124.

L'étape 9G représente le scellement direct  
10 d'une plaque de recouvrement 131 sur la couche mince 111. La plaque de recouvrement 131 comporte une partie d'extrémité 132 en surplomb pour que la plaque 131 ne recouvre pas la structure de type pointe 125. Elle comporte également un trou traversant 133 destiné à  
15 assurer une communication fluide avec le réservoir d'entrée 121. La plaque de recouvrement 131 peut être un substrat de pyrex.

Une fois le scellement obtenu, on procède au dégagement de la structure de type pointe 125 et des  
20 reprises de contact 104 et 106. Un premier clivage de la plaque 131 et un clivage du substrat 100 permet de libérer la nez d'électronébulisation. Un deuxième clivage de la plaque 131 permet de libérer les reprises de contact 104 et 106.

25

#### Cinquième mode de réalisation :

Ce mode de réalisation utilise un substrat SOI et un substrat de pyrex (« Corning » 7740) comme capot. Les électrodes, les pistes conductrices et les  
30 reprises de contact électriques sont réalisées par dépôt de métal (aluminium, platine, or...) et photo-

litographie sur la face inférieure du capot de pyrex, dans lequel elles sont « incrustées ».

La figure 10A montre un substrat SOI 140 constitué d'un support 141 en silicium de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, supportant successivement une couche d'oxyde de silicium 142 de 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et une couche mince 143 de silicium de 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.

La figure 10B montre le dispositif obtenu après une étape de gravure DRIE de la couche mince 143. La gravure permet de réaliser le réseau fluidique. Celui-ci comprend un réservoir d'entrée 151, un canal d'entrée 152, un microréacteur 153 et un canal de sortie 154. La gravure de la couche mince 143 est également réalisée sur deux bords du substrat 140 jusqu'à révéler la couche d'oxyde 142. Elle permet de définir la structure de type pointe 155.

Cette étape de gravure est classique en microtechnologie. Elle utilise un masque d'oxyde de silicium de 5000Å d'épaisseur réalisé dans un four à 1050°C en atmosphère humide. Une couche de 1,3  $\mu\text{m}$  de résine photosensible « Shipley S 1813 SP15 » est ensuite étalée sur piste « SVG » (promoteur d'adhérence : HMDS vapeur). Les motifs 1X sont insolés, puis développés par du « Shipley MIF 310 » sur piste « SVG ». Le masque d'oxyde peut alors être gravé en RIE (pour "Reactive Ion Etching") sous un mélange  $\text{CHF}_3/\text{O}_2$ , par une « Nextral 330 » par exemple. La résine est ensuite éliminée (par le procédé appelé "stripping") par du Posistrip ou du  $\text{HNO}_3$  fumant. Le silicium est alors gravé en DRIE sous un mélange  $\text{SF}_6/\text{O}_2$  à 110°C par

une « Alacatel ICP 601<sup>E</sup> » par exemple. Enfin, le masque d'oxyde est décapé par du HF 10% jusqu'à démouillage.

La structure de type pointe est ensuite dégagée par gravure chimique de la couche d'oxyde 142.

5 Cette gravure chimique peut se faire dans un bain appelé BOE (pour "Buffer Oxide Etchant" : HF/NH<sub>4</sub>F). On obtient le dispositif représenté à la figure 10C qui montre la structure de type pointe 155 en surplomb. Cette figure montre aussi que l'oxyde, précédemment

10 révélé sur l'autre bord du substrat 140, a été éliminé au cours de la gravure pour révéler le bord 144 du support 141.

Comme pour les modes de réalisation précédents, une isolation électrique du réseau

15 fluide est obtenue par oxydation thermique. Cette oxydation a lieu dans un four à 1150°C en atmosphère humide.

La figure 10D représente le scellement direct d'une plaque de recouvrement 161 sur la couche mince 143. La plaque de recouvrement 161 comporte une

20 partie d'extrémité 162 en surplomb pour que la plaque 161 ne recouvre pas la structure de type pointe 155. Elle comporte également un trou traversant 163 destiné à assurer une communication fluide avec le réservoir

25 d'entrée 151. La plaque de recouvrement 161 peut être un substrat de pyrex. La figure 10D montre aussi que la plaque 161 comporte, sur la face destinée à venir en contact avec la couche mince 143, une piste métallique

30 164 disposée de façon que son extrémité interne 165 serve d'électrode pour le canal de sortie 154 et que

son extrémité externe 166 serve de reprise de contact électrique.

Cette étape de scellement direct se fait à 400°C. Elle nécessite une bonne préparation des surface, à savoir :

- un polissage de la plaque de pyrex par une solution de KOH / HF 1% contenant une suspension de silice colloïdale, suivi d'un nettoyage classique RCVA SC1 ( $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  1/4/20 à 70°C),
- un nettoyage du substrat de silicium oxydé par un caro ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  2/1 à 140°C) suivi d'un nettoyage classique RCVA SC1 ( $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  1/4/20 à 70°C).

La structuration du capot de pyrex (gravure et « incrustation » de la piste métallique) se fait selon les étapes technologiques suivantes :

• Réalisation des gravures pour évidement de découpe et « caisson pour piste métallique » :

- dépôt Cr/Au/Cr/Au (50 Å / 3000 Å / 50 Å / 3000 Å),
- étalement de résine photosensible « Shipley S 1813 SP15 » sur piste « SVG », épaisseur 1,3 µm,
- insolation des motifs 1X et 'évidement découpe',
- développement sur piste « SVG » avec le développeur « Shipley MIF 319 »,
- gravure Au KI/I<sub>2</sub>,
- gravure Cr avec la solution appelée "Cr Etch",

- élimination de la résine par "stripping" en utilisant du « Posistrip » ou du  $\text{HNO}_3$  fumant,
- étalement de résine photosensible « Shipley S 1813 SP15 » sur piste « SVG », épaisseur  
5 1,3  $\mu\text{m}$ ,
- insolation des motifs 1X 'évidement découpe et caisson piste métallique',
- développement sur piste « SVG » au moyen du développeur « Shipley MIF 319 »,  
10
- gravure Au  $\text{KI/I}_2$ ,
- gravure Cr avec la solution appelée "Cr Etch",  
15
- gravure du verre sur 25  $\mu\text{m}$  par du HF 10%,
- élimination de la résine par "stripping" en utilisant du « Posistrip » ou du  $\text{HNO}_3$  fumant.
- Réalisation de la piste métallique « incrustée » :
  - gravure "full sheet" Au  $\text{KI/I}_2$ ,
  - gravure "full sheet" Cr avec la solution  
20 "Cr Etch",
  - gravure du verre sur 5000 Å avec une solution HF 10%,
  - décapage Au  $\text{KI/I}_2$ ,
  - décapage Cr avec la solution "Cr Etch",  
25
  - dépôt Cr/Au 50 Å/3000 Å,
  - polissage jusqu'à l'or et le verre coplanaires,
  - dépôt  $\text{SiO}_2$  par PECVD à 300°C - « STS Multiplex »,  
30
  - densification de l'oxyde en four sous gaz neutre.

## \* Ouverture des contacts :

- étalement de résine photosensible « Shipley S 1813 SP15 » sur piste « SVG » épaisseur 1,3  
5  $\mu\text{m}$ ,
- insolation des motifs 1X,
- développement sur piste « SVG » avec le développeur « Shipley MIF 319 »,
- gravure du  $\text{SiO}_2$  par le procédé RIE  
10 « Nextral 330 » - gaz  $\text{CHF}_3/\text{O}_2$ ,
- élimination de la résine par "stripping" en utilisant du Posistrip ou du  $\text{HNO}_3$  fumant.

Une fois le scellement obtenu, on procède au dégagement de la structure de type pointe 155 et de  
15 la reprise de contact 166 par clivage du support 141 (voir la figure 10E). Un premier clivage permet de libérer le nez d'électronébulisation. Un deuxième clivage permet de libérer la reprise de contact.

20 Sixième mode de réalisation (variante du cinquième mode de réalisation) :

Il s'agit d'une variante du cinquième mode de réalisation dans laquelle l'utilisation d'un substrat SOI est remplacée par l'utilisation de deux  
25 substrats de silicium.

La figure 11A montre un premier substrat en silicium 170 présentant un évidement 171 en prévision de la structure de type pointe et du clivage de ce substrat. L'évidement est obtenu par gravure RIE, DRIE  
30 ou KOH.

La figure 11B montre qu'un deuxième substrat 180 en silicium a été fixé sur la face gravée du substrat 170. Cette fixation a été obtenue par scellement direct.

5 La figure 11C montre que le deuxième substrat a été aminci pour donner une couche mince 181 en silicium.

Le réseau fluidique est ensuite réalisé comme cela est montré à la figure 11D. Au cours de  
10 cette étape, la couche mince 181 subit une gravure DRIE. Le réseau fluidique comprend un réservoir d'entrée 191, un canal d'entrée 192, un microréacteur 193 et un canal de sortie 194. La gravure de la couche mince 181 définit également la structure de type pointe  
15 195 et permet de révéler le bord 184 du substrat 170.

Comme pour les modes de réalisation précédents, on réalise ensuite une étape d'isolation électrique du réseau fluidique. Ceci est obtenu par une oxydation thermique.

20 La figure 11E représente le scellement direct d'une plaque de recouvrement 201 sur la couche mince 181. La plaque de recouvrement 201 comporte une partie d'extrémité 202 en surplomb pour que la plaque 201 ne recouvre pas la structure de type pointe 195.  
25 Elle comporte également un trou traversant 203 destiné à assurer une communication fluidique avec le réservoir d'entrée 191. La plaque de recouvrement 201 peut être un substrat en pyrex. La figure 11E montre aussi que la plaque 201 comporte, sur la face destinée à venir en  
30 contact avec la couche mince 181, une piste métallique 204 disposée de façon que son extrémité interne 205



serve d'électrode pour le canal de sortie 194 et que son extrémité externe 206 serve de reprise de contact électrique.

Une fois le scellement obtenu (voir la figure 11F), on procède au dégagement de la structure de type pointe 195 et de la reprise de contact 206 par clivage du substrat 170. Un premier clivage permet de libérer le nez d'électronébulisation. Un deuxième clivage permet de libérer la reprise de contact.

10

#### Montage pour le pompage électroosmotique

En vue d'imposer de manière externe un pompage électroosmotique dans les différents réacteurs du dispositif micro-fluidique, on peut utiliser une carte à pointes réalisée par la société MESATRONIC S.A. de Voiron (Isère, France). Une telle carte est un circuit électrique pouvant tenir aux hautes tensions (10kV) et muni d'un ensemble de pointes en platine venant tremper simultanément dans les différents réservoirs du dispositif. Différents potentiels électriques peuvent donc être imposées en divers points du dispositif afin d'en gérer les différents flux.

15

20

#### Utilisation de l'invention

La figure 12 montre comment l'ensemble des dispositifs « réseau fluidique et nez d'électronébulisation » 211 peuvent être répartis sur un substrat circulaire 210 afin de disposer d'un objet unique à N dispositifs microfluidiques, facilitant ainsi un usage à « haut débit » d'analyses.

25

30

Dans cette configuration, les réseaux fluidiques sont dessinés radialement, selon les rayons du substrat circulaire 210. N nez d'électronebulisation sont alors répartis selon la circonférence du substrat, et il suffit de faire tourner manuellement ou automatiquement celui-ci pour réaliser un enchaînement en série d'analyses au spectromètre de masse 212. Pour cela, le support du substrat pourra être monté sur un axe rotatif. La préparation des échantillons, elle, peut être réalisée au préalable en parallèle sur les N dispositifs.

#### Applications industrielles

Les applications possibles de l'invention sont toutes celles qui utilisent pour méthode de détection la spectrométrie de masse avec pour interface la technique d'ionisation par électrospray (ESI pour "ElectroSpray Ionisation").

On peut citer à titre d'exemple l'analyse d'échantillons dans le secteur biomédical et l'industrie pharmaceutique :

- analyses génétiques,
- protéomique (identification de protéines...),
- développement de médicaments.

## REVENDICATIONS

1. Laboratoire sur puce comprenant un support (51, 81, 100, 141, 170), au moins un réseau  
5 fluïdique, au moins un orifice d'entrée de fluïde relié  
au réseau fluïdique et au moins un orifice de sortie de  
fluïde relié au réseau fluïdique, caractérisé en ce  
qu'il comprend une couche mince (53, 83, 111, 143, 181)  
solidaire du support et dans laquelle sont réalisés le  
10 réseau fluïdique et un nez d'électronébulisation (65,  
95, 125, 155, 195), le nez d'électronébulisation étant  
en surplomb par rapport au support et comprenant un  
canal (64, 94, 124, 154, 194) dont une extrémité est  
reliée au réseau fluïdique et dont l'autre extrémité  
15 constitue ledit orifice de sortie de fluïde, le canal  
étant équipé de moyens de conduction électrique (59,  
89, 129, 165, 205) formant au moins une électrode.

2. Laboratoire sur puce selon la  
20 revendication 1, caractérisé en ce que la couche mince  
(53 ; 83 ; 143) est la couche de matériau semi-  
conducteur d'un substrat du type semi-conducteur sur  
isolant (50 ; 80 ; 140), le reste du substrat  
constituant ledit support (51, 52 ; 81, 82 ; 141, 142).

25

3. Laboratoire sur puce selon la  
revendication 2, caractérisé en ce que le substrat du  
type semi-conducteur sur isolant est un substrat SOI.

30

4. Laboratoire sur puce selon l'une des  
revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que les moyens

de conduction électrique (59, 89) sont une partie dopée de ladite couche de matériau semi-conducteur (53, 83).

5 5. Laboratoire sur puce selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend un capot (71, 161) recouvrant hermétiquement le réseau fluide, ce capot étant pourvu d'un moyen d'accès fluide (73, 163) à l'orifice d'entrée de fluide.

10

6. Laboratoire sur puce selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce qu'il comprend un capot (161) recouvrant hermétiquement le réseau fluide, ce capot étant pourvu d'un moyen d'accès fluide (163) à l'orifice d'entrée de fluide et étant pourvu desdits moyens de conduction électrique (165).

7. Laboratoire sur puce selon la revendication 1, caractérisé en ce que la couche mince (111, 181) est une couche fixée sur le support (100, 170).

8. Laboratoire sur puce selon la revendication 7, caractérisé en ce que le support (100) étant en matériau semi-conducteur, les moyens de conduction électrique (129) sont une partie dopée dudit support.

9. Laboratoire sur puce selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il comprend un capot (131, 201) recouvrant hermétiquement le réseau

30

fluidique, ce capot étant pourvu d'un moyen d'accès  
fluidique (133, 203) à l'orifice d'entrée de fluide.

5 10. Laboratoire sur puce selon la  
revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend un  
capot (201) recouvrant hermétiquement le réseau  
fluidique, ce capot étant pourvu d'un moyen d'accès  
fluidique (203) à l'orifice d'entrée de fluide et étant  
pourvu desdits moyens de conduction électrique (205).

1/16

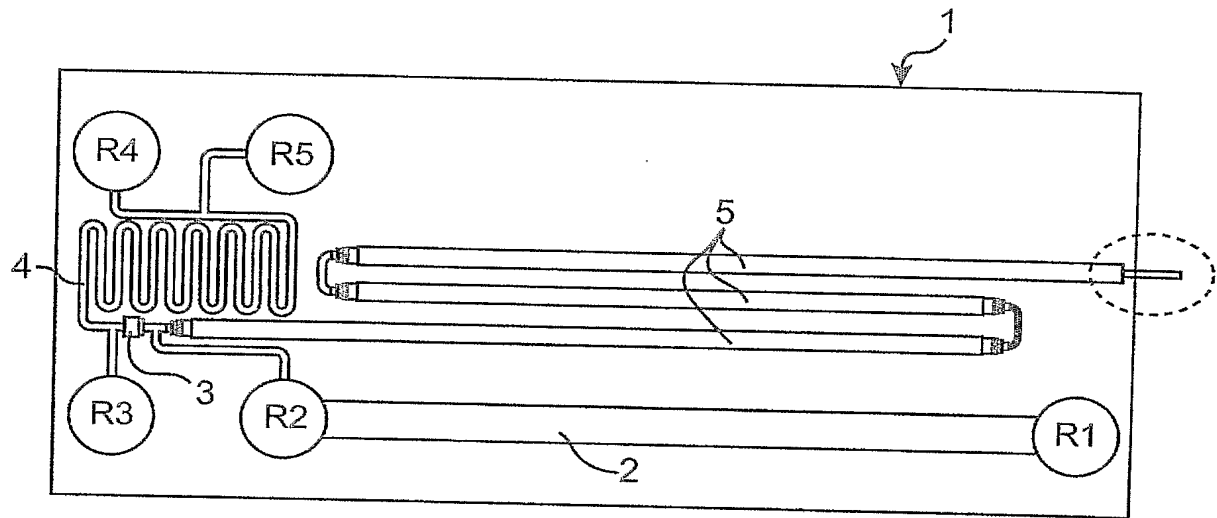


FIG. 1

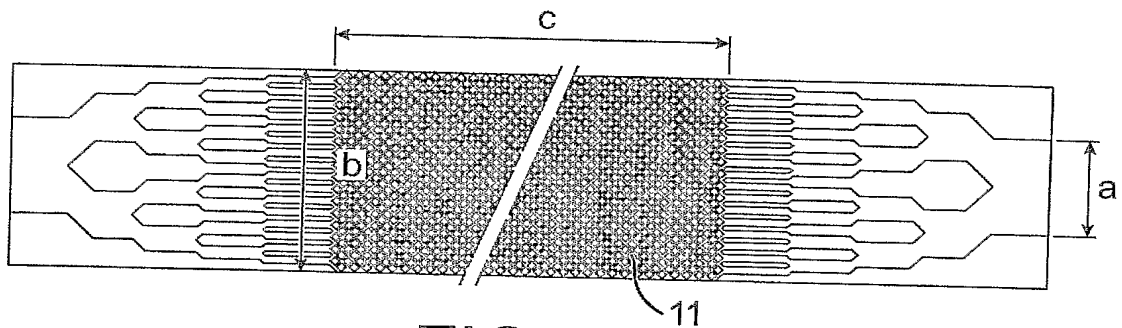


FIG. 2

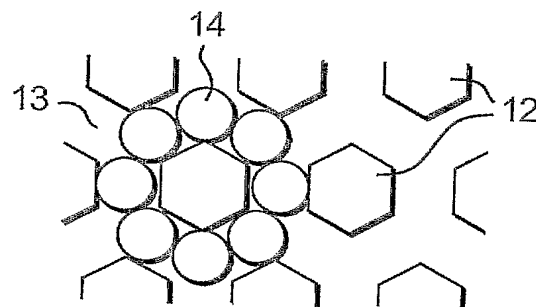


FIG. 2A

2/16

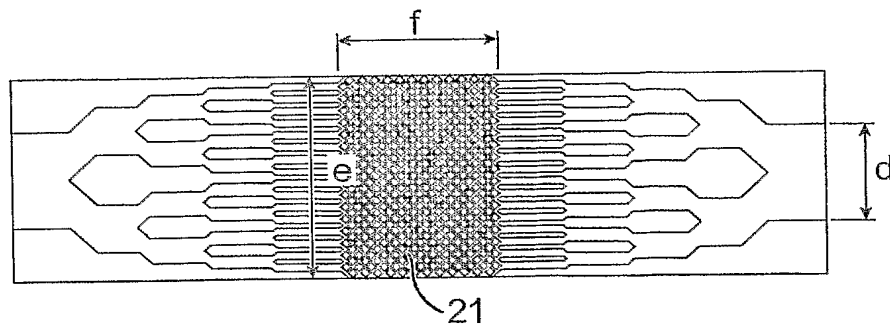


FIG. 3

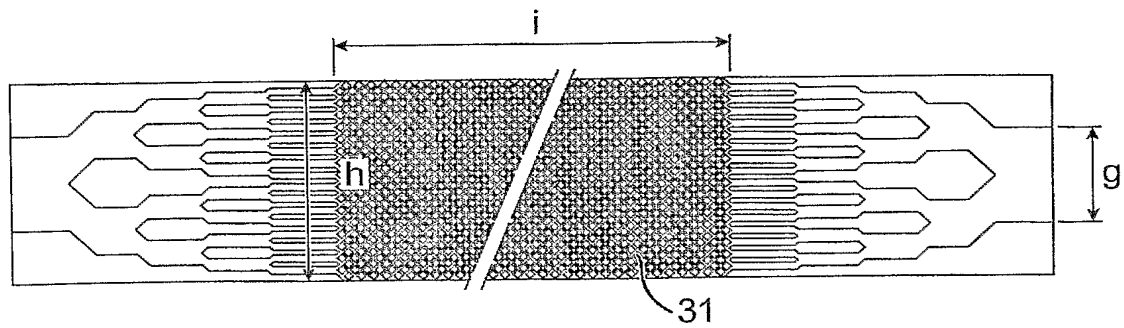
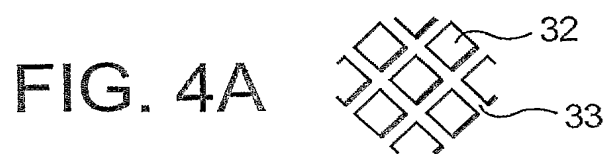


FIG. 4



3/16

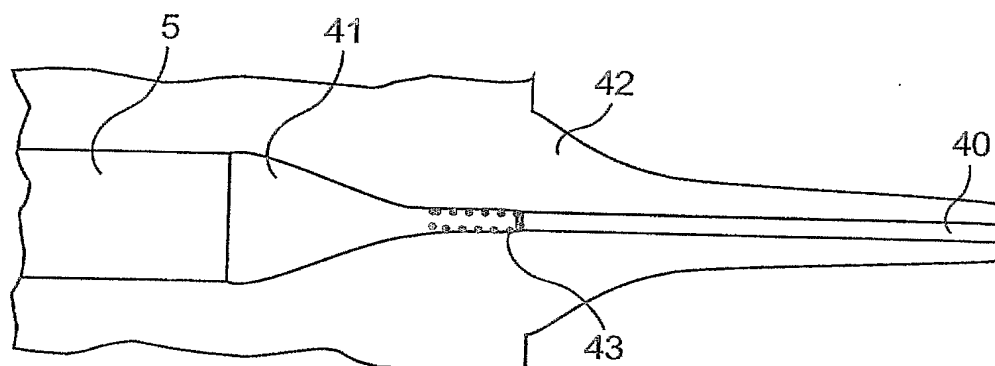


FIG. 5

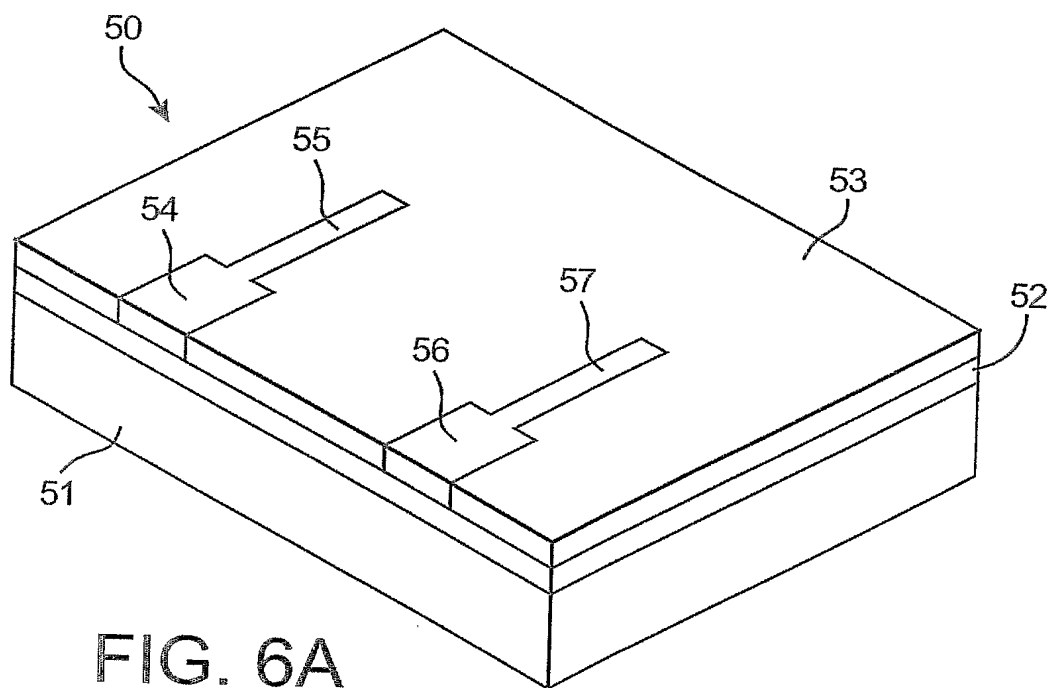


FIG. 6A



4/16

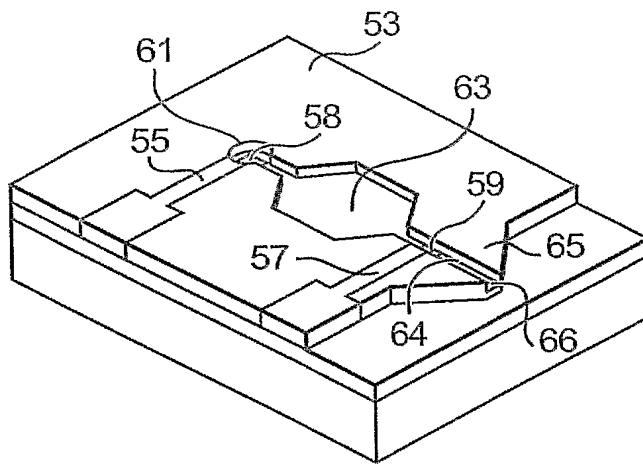


FIG. 6B

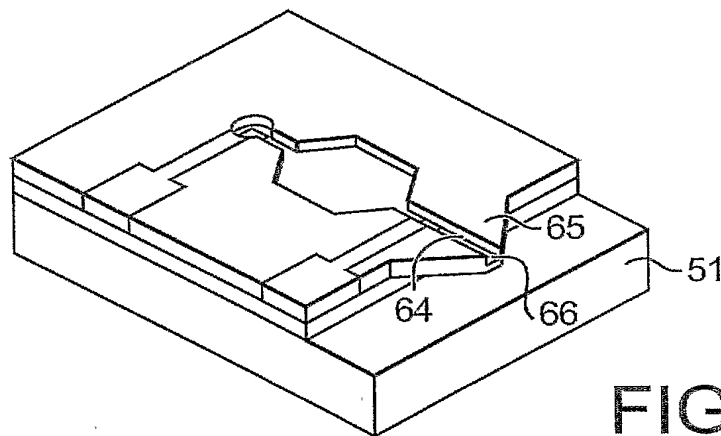


FIG. 6C

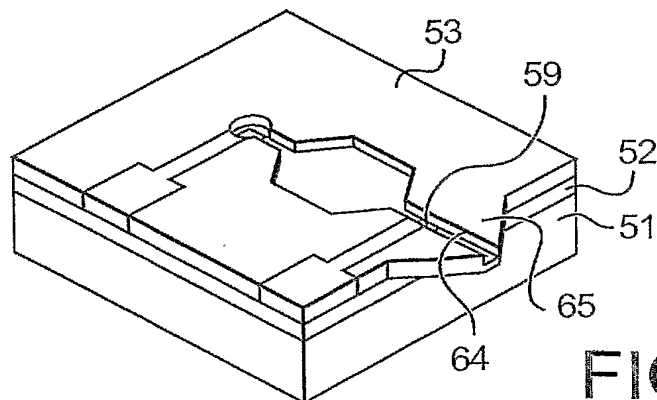


FIG. 6D

5/16

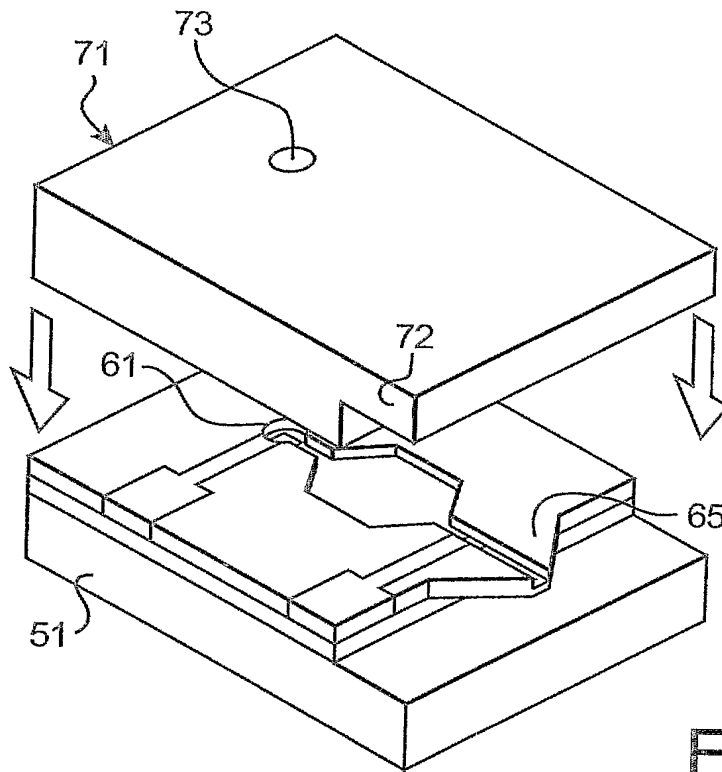


FIG. 7A

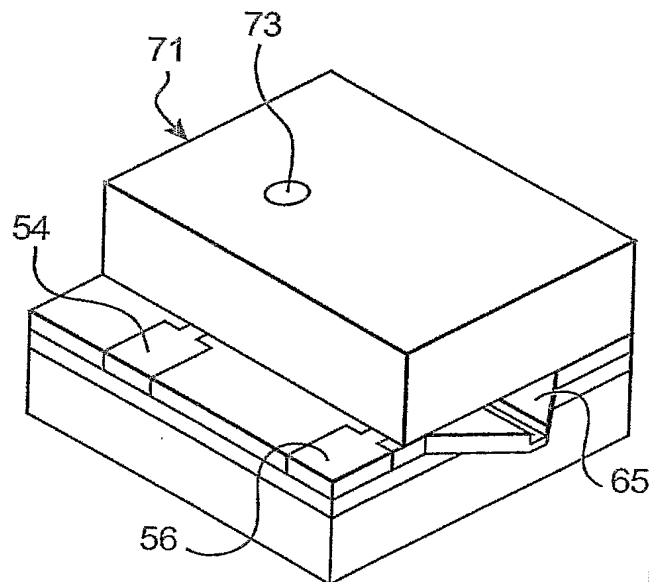


FIG. 7B

6/16

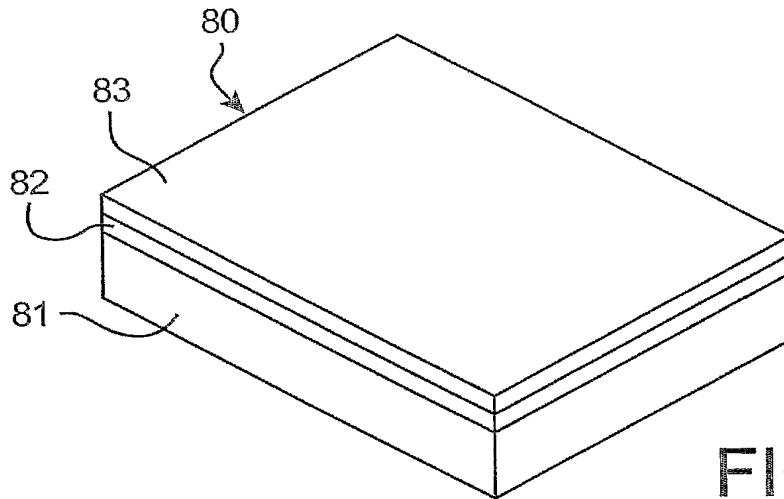


FIG. 8A

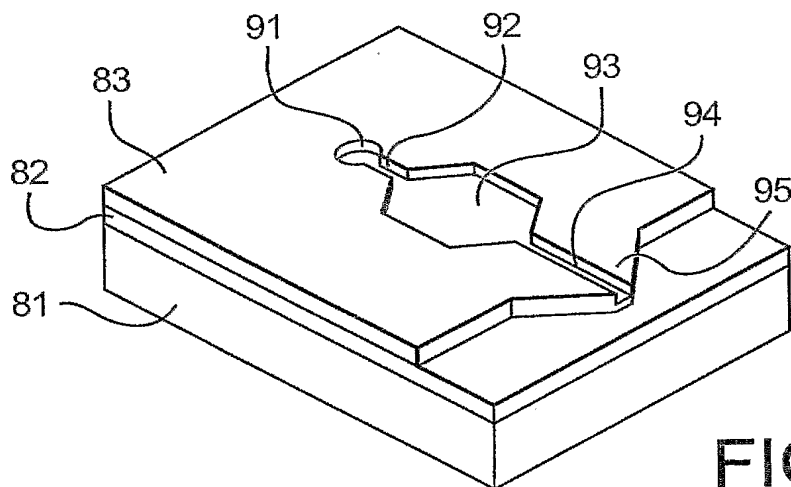


FIG. 8B

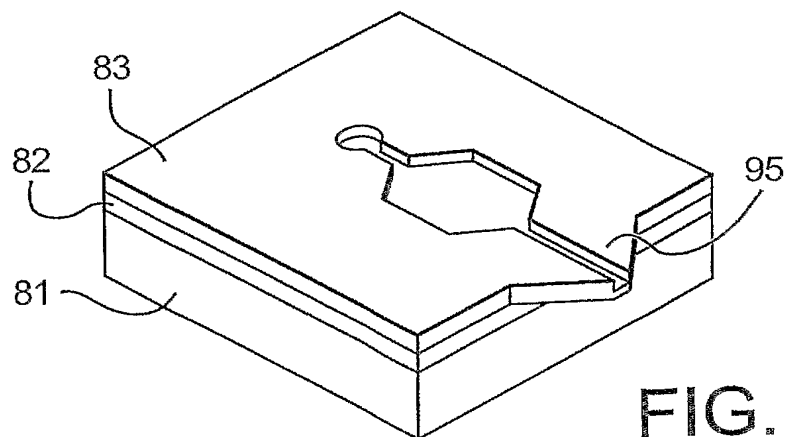


FIG. 8C

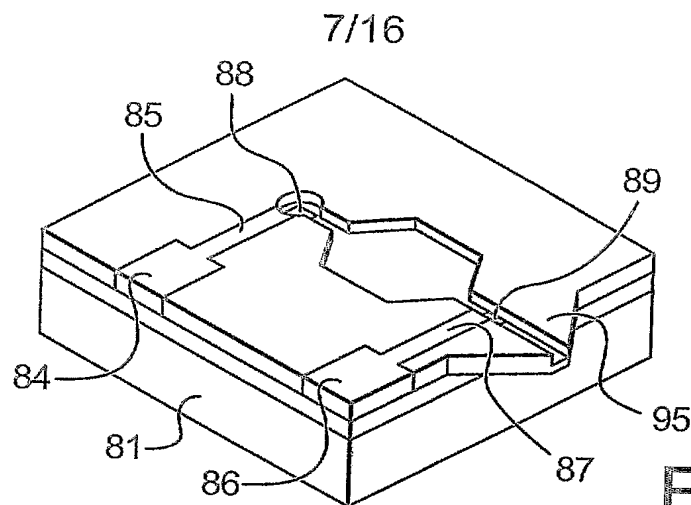


FIG. 8D

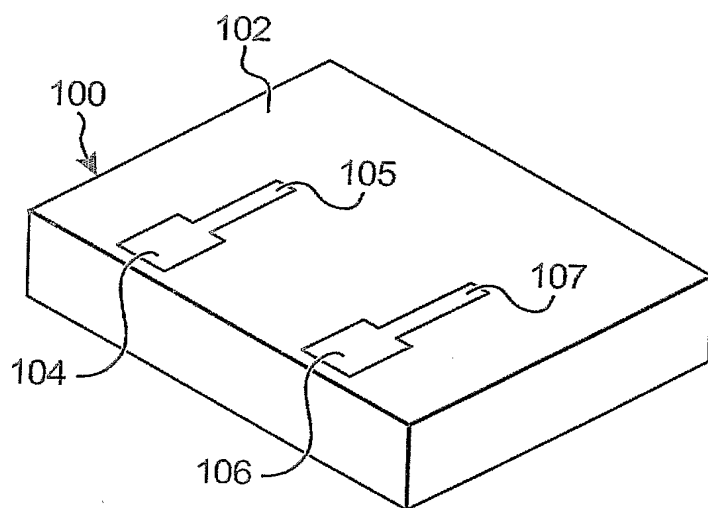


FIG. 9A

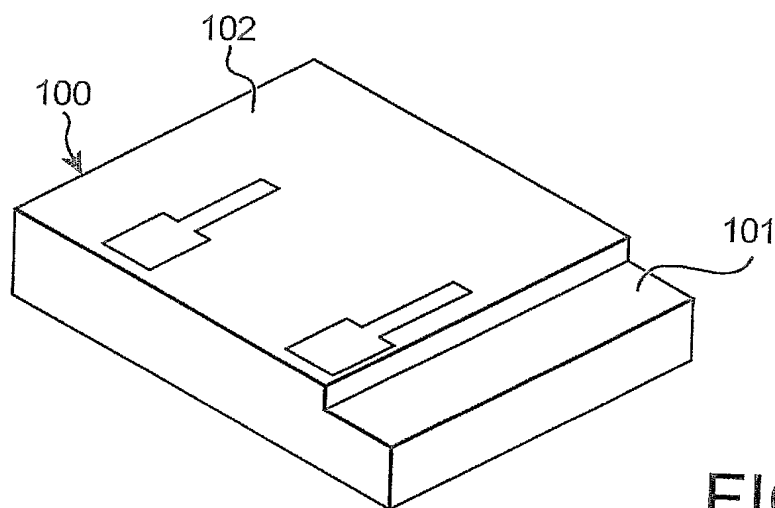


FIG. 9B

8/16

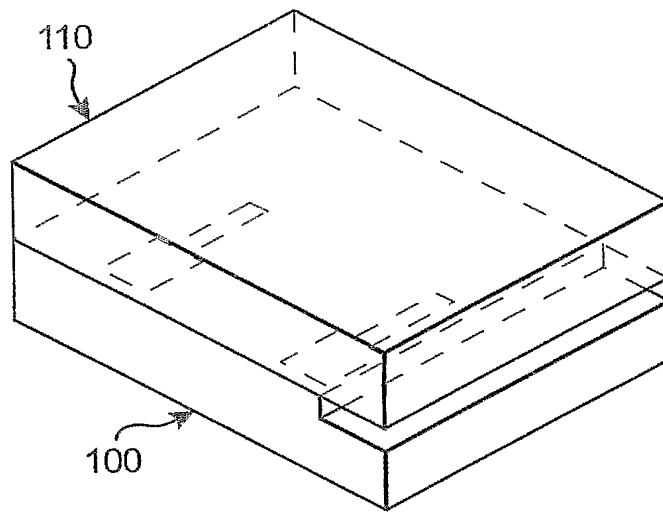


FIG. 9C

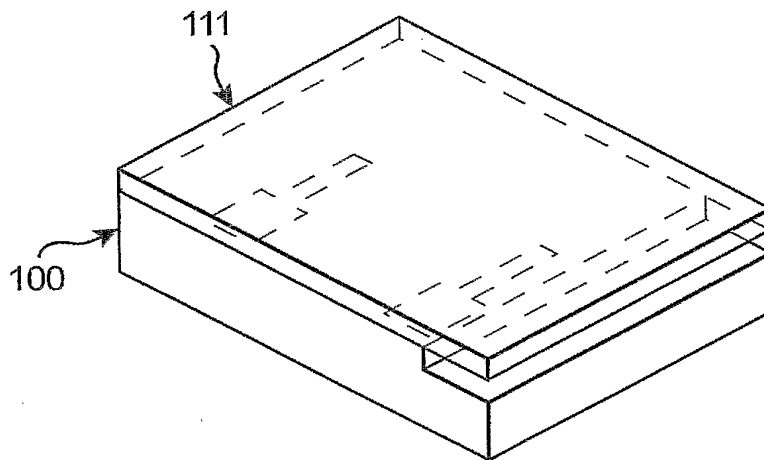


FIG. 9D

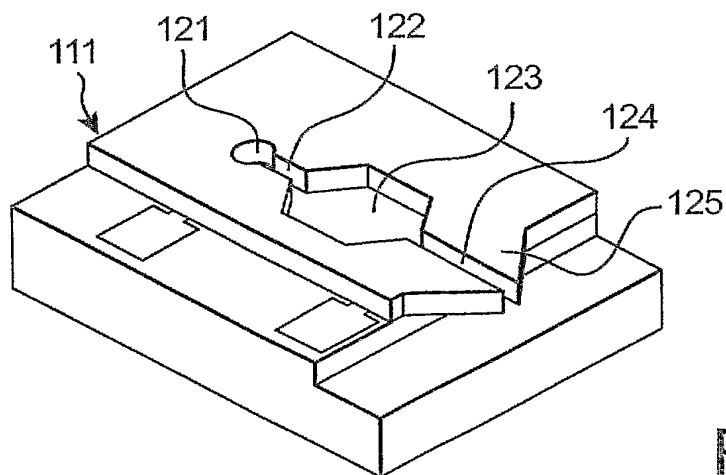


FIG. 9E

9/16

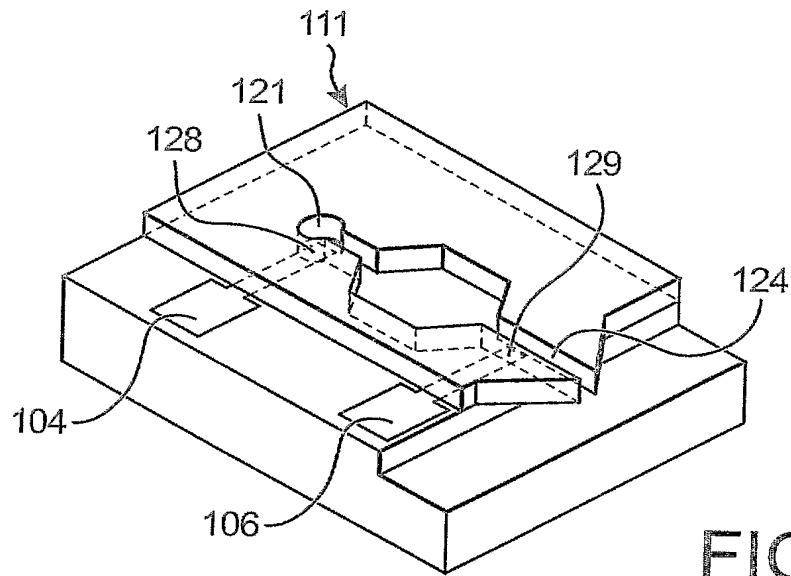


FIG. 9F

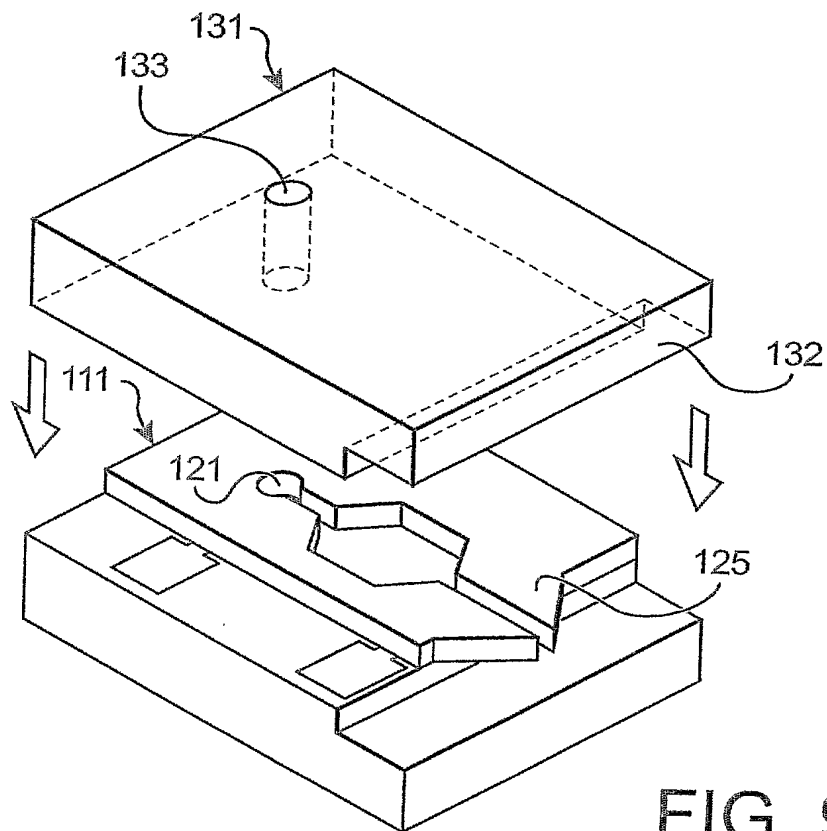


FIG. 9G

10/16

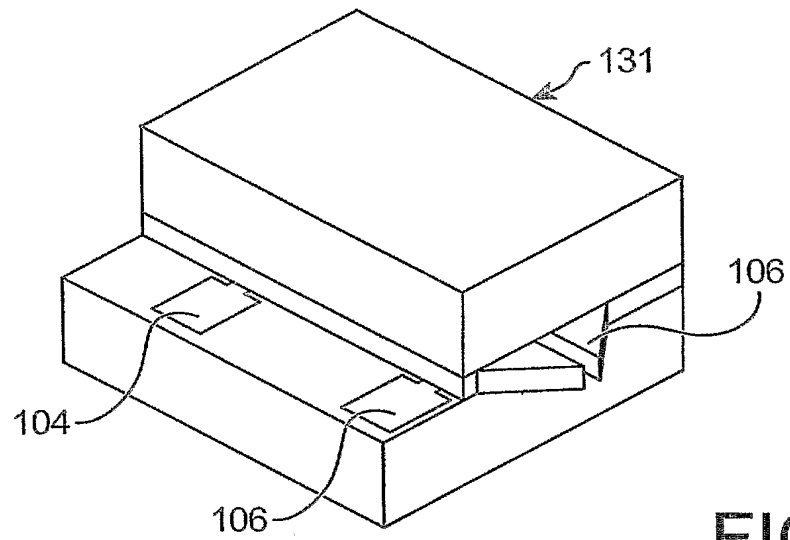


FIG. 9H

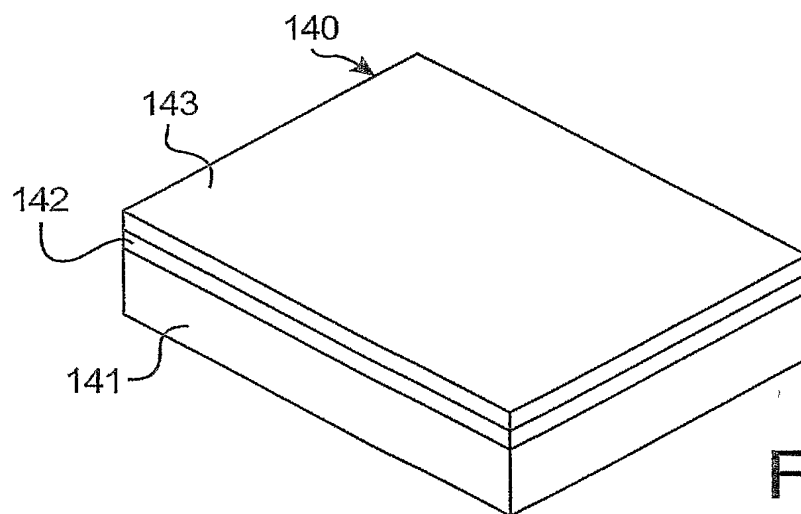


FIG. 10A

11/16

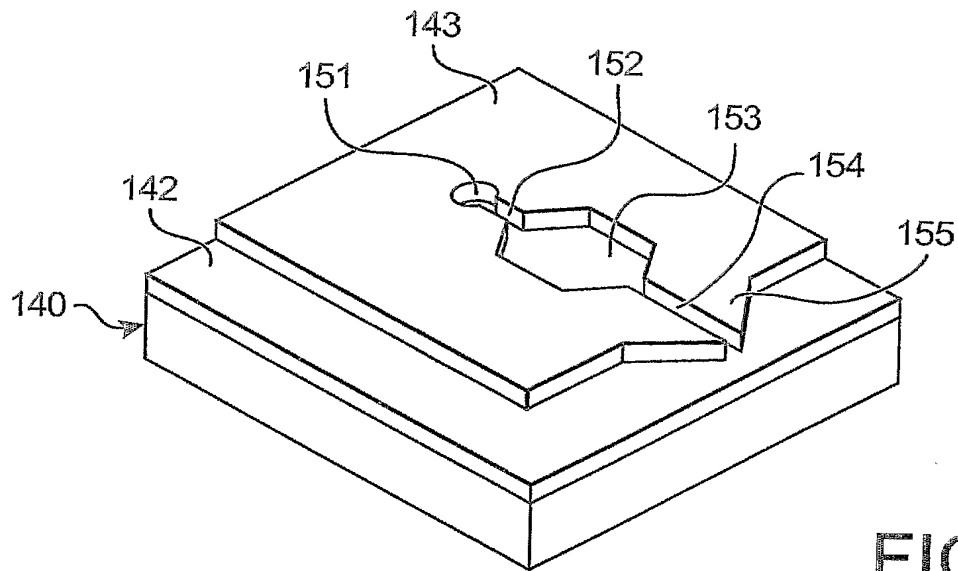


FIG. 10B

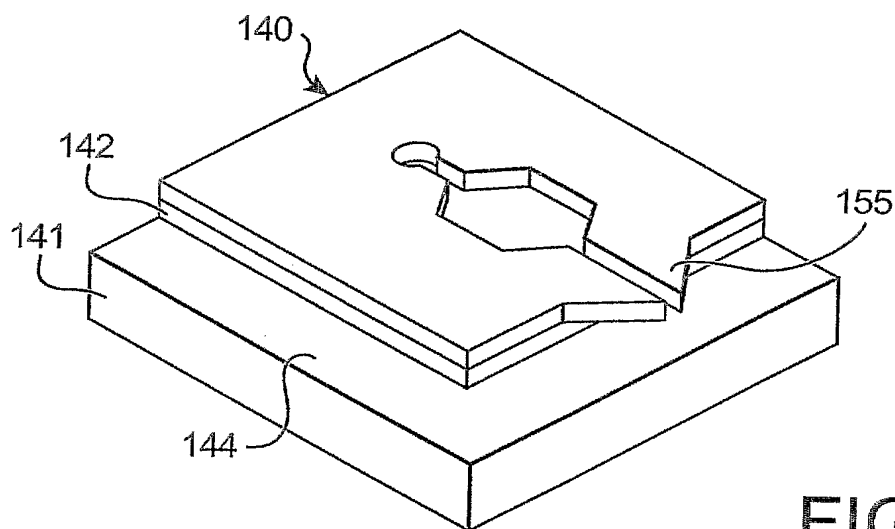


FIG. 10C



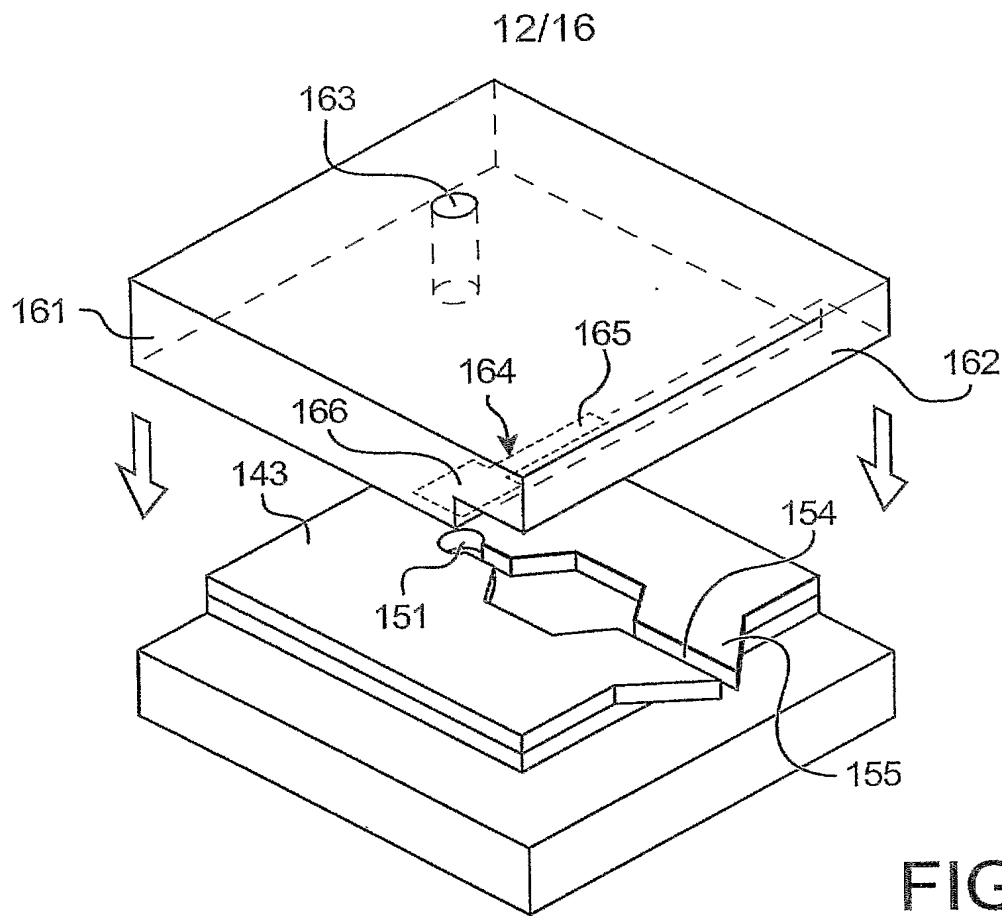


FIG. 10D

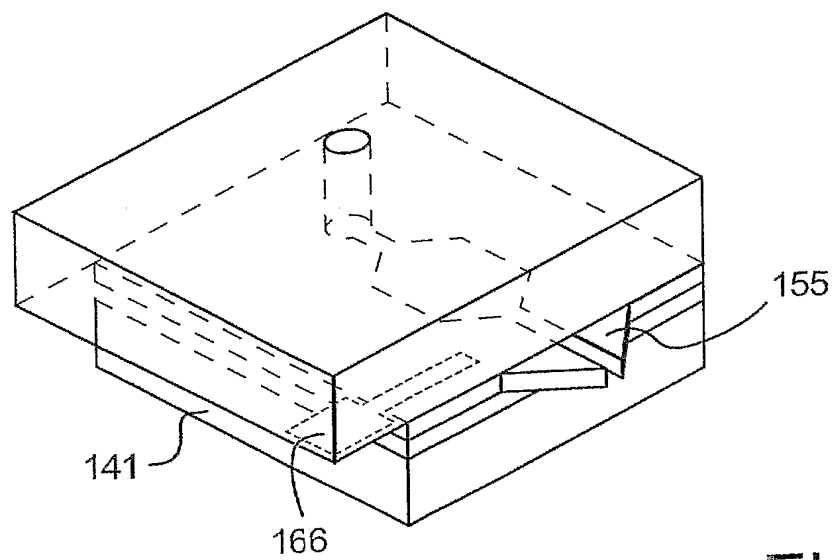


FIG. 10E

13/16

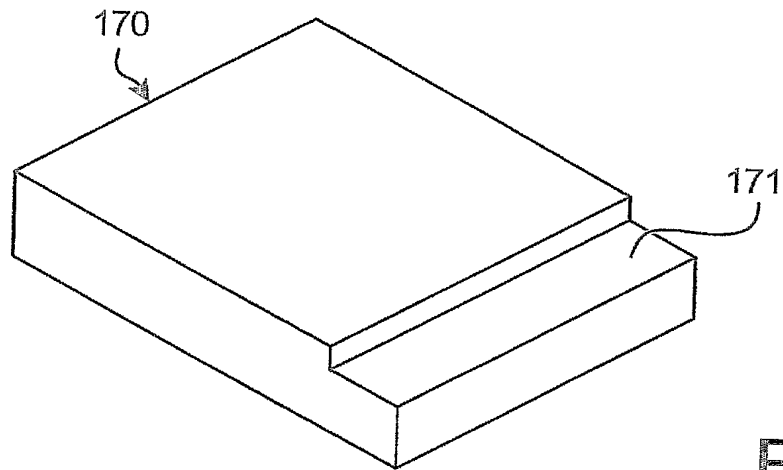


FIG. 11A

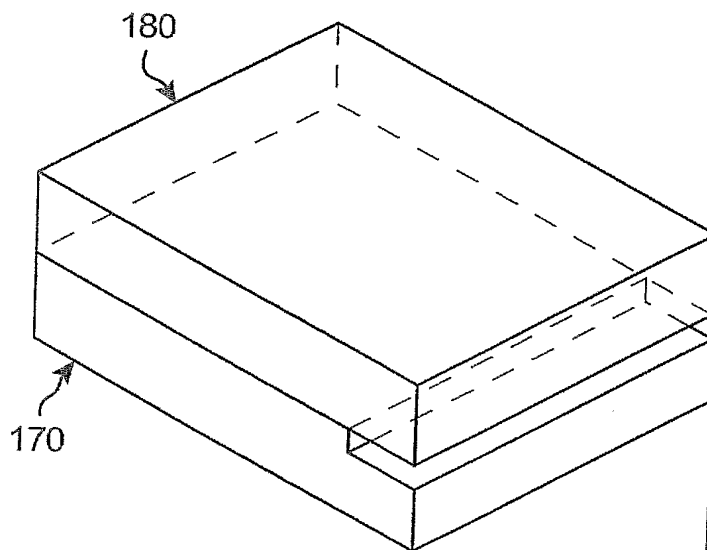


FIG. 11B

14/16

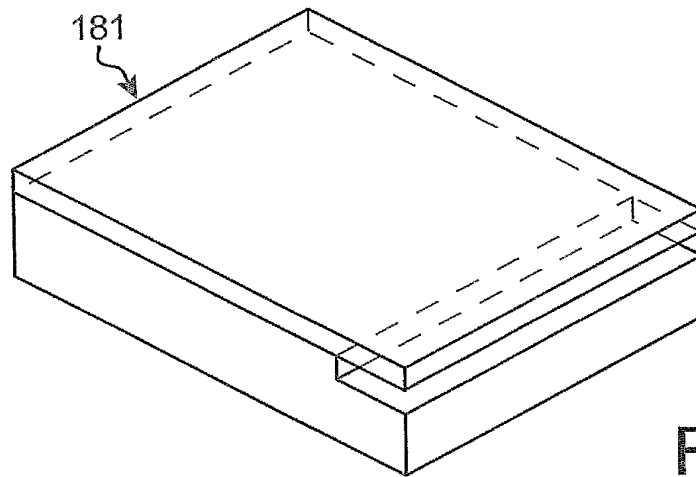


FIG. 11C

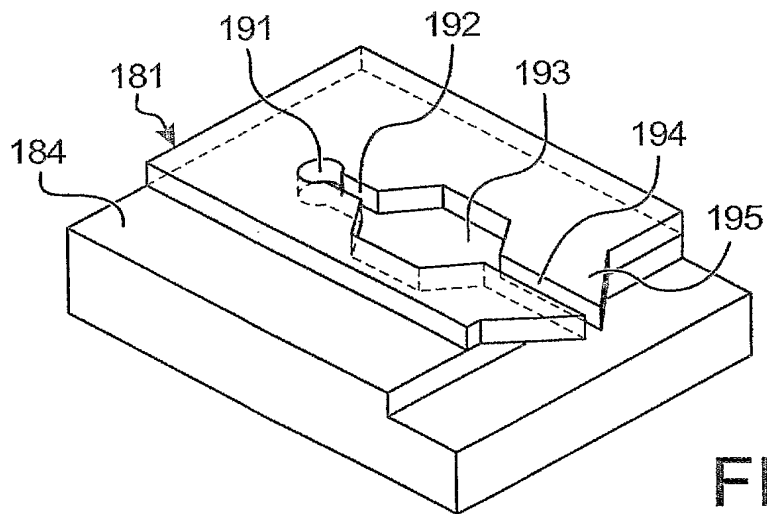


FIG. 11D

15/16

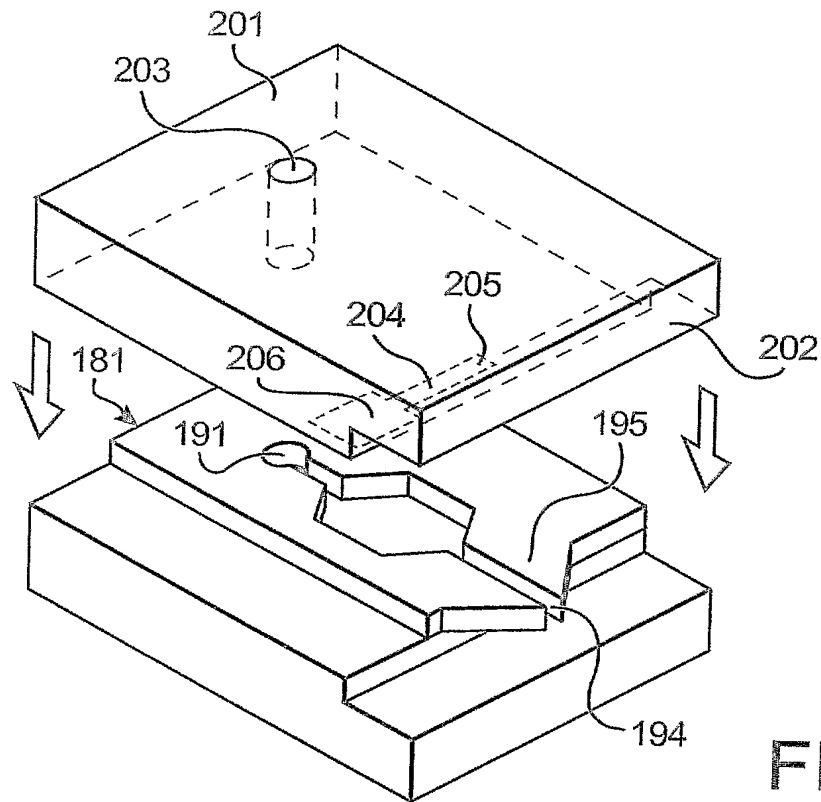


FIG. 11E

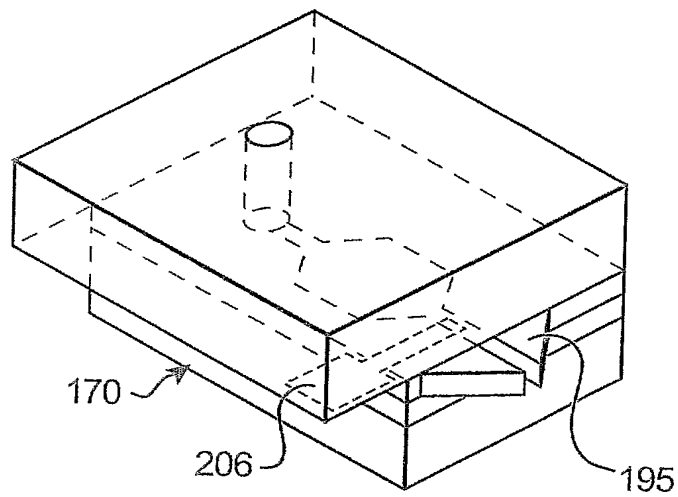


FIG. 11F

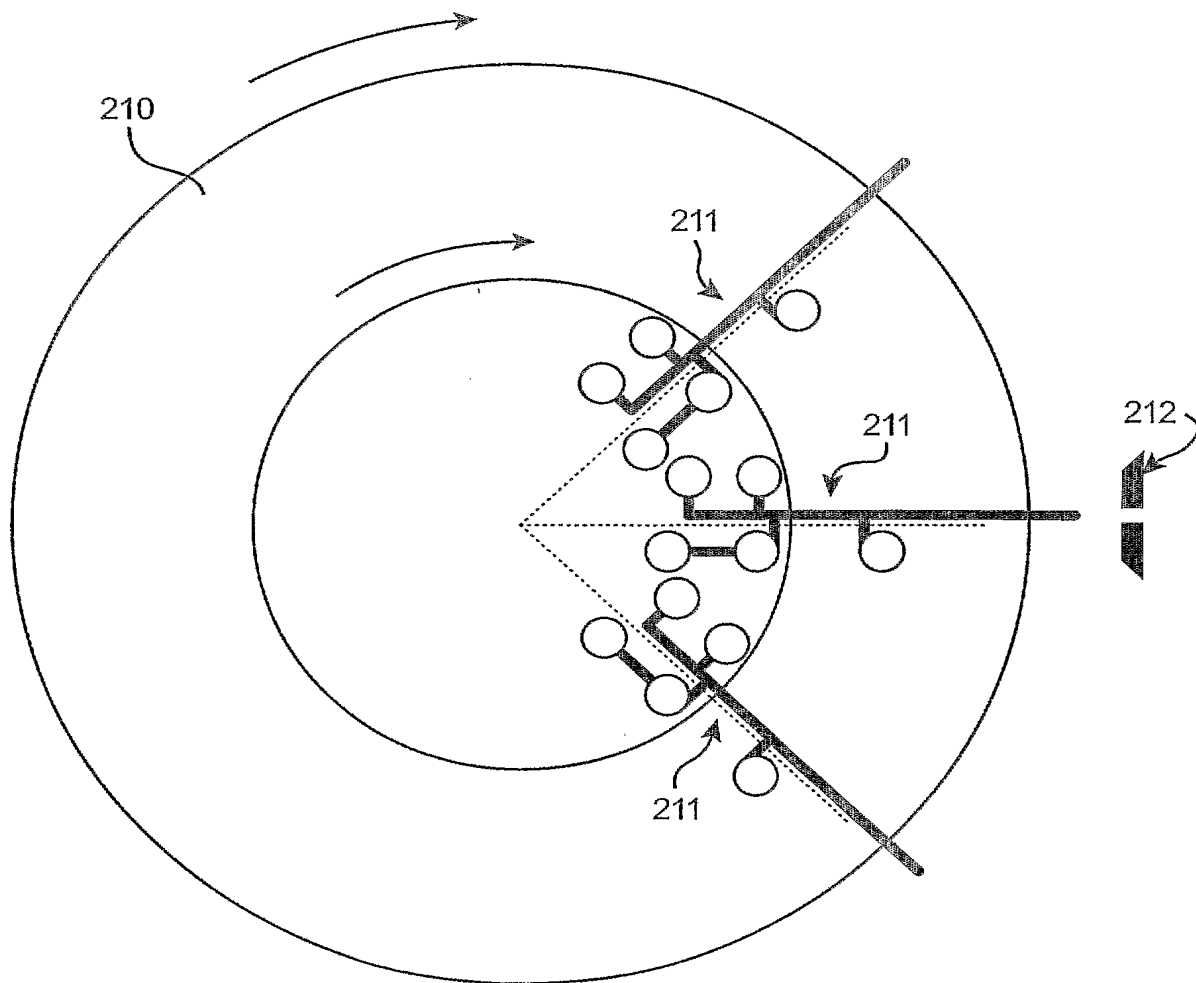


FIG. 12



## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

### Désignation de l'inventeur

Vos références pour ce dossier	B14577-DD2672
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
TITRE DE L'INVENTION	
	LABORATOIRE SUR PUCE COMPRENANT UN RESEAU MICRO-FLUIDIQUE ET UN NEZ D'ELECTRONEBULISATION COPLANAIRES
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	SARRUT
Prénoms	Nicolas
Rue	140 rue Georges Maeder
Code postal et ville	38170 SEYSSINET-PARISSET
Société d'appartenance	
Inventeur 2	
Nom	CONSTANTIN
Prénoms	Olivier
Rue	9 rue Léo Lagrange
Code postal et ville	38100 GRENOBLE
Société d'appartenance	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

#### Signé par

Signataire: FR, Brevatome, J.Lehu

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

#### Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



PCT/FR2005/050053

